

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTREAL

MÉCANISMES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE CHOC
THERMIQUE ET EFFET PROTECTEUR DE LA THERMOTOLÉRANCE
INDUITE À 40°C.

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

AHMED BETTAIEB

Mars 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À mes parents

À qui, plus que tous autres, je tiens à dédier cette thèse. Qu'ils trouvent dans ce manuscrit le fruit de leur dévouement investi pour mon éducation, et l'expression de mon amour et de ma gratitude pour leur intarissable soutien.

À ma directrice de recherche

D^r. Diana Averill-Bates

Qui m'a guidé avec patience et qui me fait l'honneur de juger ma thèse. Qu'elle trouve ici mes plus vifs remerciements pour l'attention portée à la conception de ce projet de recherche qui, je l'espère, apparaîtra comme un modeste reflet de sa grandeur d'esprit.

À mes juges

D^r. Fathey Sarhan

D^r. Benoît Barbeau

D^{re}. Celine Bergeron

Qui me font l'honneur de s'intéresser à ma thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

À mes frères et sœurs

À ma femme

À mes amis

Sami, Anouar, Yulia, Catherine, Paulina, Kamini et Valérie

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le docteur Diana Averill-Bates, qui m'a fait l'honneur d'accepter la supervision de mes études de maîtrise et de doctorat. Je la remercie tout particulièrement pour la rigueur scientifique qu'elle a su m'inculquer durant mes six années d'études à ces côtés. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma plus haute considération et de mon plus profond respect.

Je voudrais également sincèrement remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer et de critiquer judicieusement ce manuscrit, soit Messieurs Fathey Sarhan et Benoit Barbeau, ainsi que Madame Celine Bergeron. Vous contribuerez ainsi à assurer la qualité et la rigueur scientifique de cette thèse. Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement Messieurs Michel Marion et Denis Flipo pour leur intuition et leurs nombreux conseils. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Paulina Wrzal, Catherine Lauzon, Kamini Barot, Valérie Leduc, et à tous les membres du laboratoire du Dr. Fathey Sarhan pour leurs précieux conseils, leur aide, leur support et leur amitié.

Je remercie mes parents, mes frères, mes sœurs, et mes amis, notamment Sami, Anouar, Kais et en particulier Yulia Zilber, qui ont toujours été là pour moi au cours de ces années de travail, de découverte et de plaisir.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Tunisie et le Ministère de l'Éducation, du Loisir et du Sport du Québec qui, de part leur contributions financières, ont contribué à l'avancement de la science et aux découvertes significatives exposées dans ce manuscrit.

Merci à tous.

AVANT-PROPOS

Dans ce document préparé comme exigence partielle du programme de Doctorat en Biologie à l'Université du Québec à Montréal, nous avons voulu poursuivre un double objectif : présenter les travaux de recherche effectués dans le cadre de cette activité et éveiller l'attention et l'intérêt de la communauté scientifique, en particulier, mais également celle de la société en général sur l'extrême gravité d'une maladie bien particulière : le cancer.

Cliniquement identifié depuis la haute Antiquité, le cancer revêt aujourd'hui une importance sanitaire, économique, sociale et culturelle qui amène chacun de nous à se poser la question « qu'elle est la solution ? ». Le dernier rapport sur la maladie, publié en février 2008 par l'Association Internationale Contre le Cancer (UICC), brosse des tableaux alarmants de la situation dans le monde entier, et plus particulièrement dans les pays en développement. Mondialement, tout près de onze millions de personnes reçoivent annuellement un diagnostic de cancer, et de ce nombre, sept millions y trouveront la mort. D'ici 2020, ces chiffres atteindront respectivement seize et dix millions de cas annuellement. Malgré la grande variabilité de son taux d'incidence, le cancer est un fléau qui touche tous les pays. Notamment, au Canada, le cancer est considéré comme la première cause de mortalité, et le nombre de nouveaux cas est toujours à la hausse.

Les impacts de cette maladie sont bien sûr dramatiques pour l'individu, mais ils sont aussi lourds de conséquences pour la société, et ce particulièrement pour des raisons socio-économiques. En effet, le cancer engendre des coûts tant pour le patient que pour la société. D'abord, on doit tenir compte des coûts associés directement à la prise en charge de la maladie, notamment les frais médicaux et hospitaliers (médecins, médicaments, prise en charge des personnes atteintes), les fonds alloués par les politiques publiques (octroyés pour la recherche, la formation, la prévention et la sensibilisation), les frais associés aux dommages psychologiques (généralement pour

la famille et les proches, suite au décès du patient), et les frais associés à l'environnement (préparation et extraction des médicaments). Ensuite, on doit également considérer les coûts qui résultent indirectement de la maladie, tels les pertes de production marchande et non marchande (temps passé dans les institutions de santé, absentéisme au travail, mort prématurée, etc.). Ainsi, malgré la controverse existant à l'égard du coût exact qu'il représente, tous s'entendent sur le fait que le cancer coûte énormément cher à la société. De plus, le coût élevé, la toxicité potentielle et l'efficacité limitée des méthodes classiques de traitement du cancer (radiothérapie, chimiothérapie et chirurgie) ne font qu'amplifier le sentiment d'urgence d'agir afin de développer de nouvelles stratégies de traitement du cancer avant tout moins coûteuses, plus efficaces et moins toxiques.

Le premier chapitre de ce document sera consacré à définir ce qu'est le cancer et à identifier les causes, les risques et les conséquences inhérents à cette maladie. Le deuxième chapitre sera consacré aux procédures thérapeutiques existantes, à leurs avantages et désavantages. Dans les quatre chapitres subséquents, je présenterai une nouvelle stratégie biologique de traitement du cancer peu coûteuse et de très haute efficacité. Le but de cette étude prospective sera donc de mettre en évidence et de démontrer scientifiquement l'intérêt clinique que représente le traitement des maladies cancéreuses par l'utilisation de l'hyperthermie, étant donné son efficacité à combattre les cellules cancéreuses tout en préservant l'intégrité des tissus sains adjacents.

Je ne conclurai pas cet avant-propos sans citer celle à qui je dois tant de remerciements, après Dieu, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche et pour toutes les ressources, autant matérielles qu'intellectuelles, qu'elle a mises à ma disposition afin que je puisse réaliser cette étude, à savoir le docteur Diana Averill-Bates. Je vous remercie sincèrement.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xvii
RÉSUMÉ	xx
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LE CANCER	1
1.1 Le cancer : Histoire et regards portés sur la maladie.....	1
1.2 Statistiques et faits saillants	3
1.3 Définition d'un cancer	4
1.3.1 L'initiation.....	6
1.3.2 La promotion	6
1.3.3 La progression	7
1.3.4 La désorganisation tissulaire et le phénomène invasif	7
1.3.5 L'angiogenèse et la "stroma-réaction"	8
1.3.6 Les métastases ganglionnaires.....	9
1.3.7 Les métastases sanguines	10
1.4 Facteurs de risques.....	12

1.4.1 Facteurs non modifiables.....	12
1.4.1.1 L'âge.....	13
1.4.1.2 Le sexe.....	13
1.4.1.3 L'hérédité	13
1.4.2 Facteurs modifiables.....	14
1.4.2.1 L'obésité	14
1.4.2.3 L'alimentation et le cancer	15
1.4.2.4 Le tabac	17
1.4.2.5 Les infections virales, bactériennes et parasitaires.....	19
1.4.2.6 Exposition aux rayons solaires et aux radiations.....	20
1.4.2.7 Autres facteurs de risque modifiables liés à l'environnement et aux comportements	21
1.5 Le traitement du cancer.....	21
1.5.1 Les méthodes classiques.....	22
1.5.1.1 La chirurgie	22
1.5.1.2 La chimiothérapie.....	23
1.5.1.3 La radiothérapie :.....	25
1.5.1.4 L'immunothérapie	27
1.5.1.5 L'hormonothérapie.....	28
1.5.2 Les méthodes alternatives	28
1.5.2.1 L'enzymothérapie.....	28
1.5.2.2 La thérapie génique	29
1.5.3 Thérapies complémentaires	30
1.5.3.1 La thérapie orthomoléculaire.....	30
1.5.3.2 La thérapie anti-angiogénique	31
1.5.3.3 L'ozonothérapie.....	31
1.5.3.4 L'hyperthermie :	31

CHAPITRE II : L'APOPTOSE	35
2.1 Introduction.....	35
2.1.1 La mort cellulaire non programmée passive qui comprend l'oncose et la nécrose :.....	35
2.1.2 La mort cellulaire programmée active.....	36
2.1.2.1 La mort cellulaire indépendante des caspases et impliquant l'autophagie de type II et la paraptose de type III	37
2.1.2.2 La mort cellulaire dépendante des caspases et impliquant l'apoptose de type I	40
2.2 Généralités sur l'apoptose.....	41
2.3 Changements morphologiques au cours de l'apoptose.....	42
2.4 Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose	43
2.4.1 Voie des récepteurs de mort cellulaire	45
2.4.2 Voie intrinsèque : voie mitochondriale	47
2.4.2.1 Rôle de la famille Bcl-2.....	50
2.4.2.2 Le pore de perméabilité transitoire (PPT)	54
2.4.2.3 La formation de canaux ioniques non spécifiques	54
2.4.2.4. Rôle des caspases dans la transduction du signal apoptotique	56
2.4.3 Apoptose induite par le réticulum endoplasmique.....	62
2.4.3.1 La réponse UPR.....	62
2.4.3.2 L'apoptose via la voie du RE	65
2.4.3.3 Rôle du calcium dans la régulation de l'apoptose.....	69
2.4.3.4 Rôle des calpaïnes dans la régulation de l'apoptose	73
2.4.3.4.1 Régulation des calpaïnes	73
2.4.3.4.2 Rôles des calpaïnes.....	74

2.5 Protéines régulatrices de l'apoptose	77
2.5.1 La protéine inductrice de l'apoptose (AIF)	77
2.5.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs)	79
2.5.2 FLIP	81
CHAPITRE III : LES MAP KINASES	82
3.1 La voie des JNKs	84
3.1 La voie des JNKs	85
3.1.1 Rôle pro-apoptotique des JNKs	85
3.1.2 Rôle anti-apoptotique des JNKs	86
3.2 Voie des p38	87
3.2.1 Substrats de protéine kinase de p38	88
3.2.2 Rôle de la p38 dans l'expression génique	89
3.2.3 Rôle biologique des p38	90
3.3 Les kinases ERK1 et 2	91
3.3.1 Propriétés d'ERK1/2	92
3.3.2 Implication d'ERK1/2 dans les mécanismes de survie cellulaire (rôle anti-apoptotique d'ERK1/2)	93
3.3.3 ERK3	97
3.3.4 ERK4	97
3.3.5 ERK5	98
3.3.6 ERK6	100
3.3.7 ERK7/8	102
CHAPITRE IV : LA PROTÉINE p53	103

4.1 Arrêt du cycle cellulaire.....	105
4.2 Contribution de la p53 à l'apoptose.....	106
CHAPITRE V : LES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE	109
5.1 La famille des HSPs 70.....	110
5.2 La famille des HSPs 27.....	112
5.3 La famille des HSPs 90.....	113
5.4 L'hème oxygénase	114
5.5 La famille des GRPs	115
CHAPITRE VI : RÔLE DU CHOC THERMIQUE ET DE L'HYPERTHERMIE DANS LA RÉGULATION DE LA CASCADE APOPTOTIQUE	118
6.1 Les effets du choc thermique sur les cellules	119
6.2 La thermotolérance	121
CHAPITRE VII : INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE STRESS OXYDATIF	125
7.1 Le stress oxydatif.....	125
7.2 Les espèces réactives oxygénées ou EORs.....	125
7.3 Nocivité des EORs.....	126
7.4 Mécanismes de défenses cellulaires contre les EORs	127
7.5 Stress oxydatif et apoptose	133

7.5.1 Induction de la voie mitochondriale par les EORs.....	133
7.5 2 La voie des récepteurs de mort et les EORs.....	134
CHAPITRE VIII : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	136
CHAPITRE IX : RÉSULTATS ET CONTRIBUTIONS.....	146
ARTICLE 1: THERMOTOLERANCE INDUCED AT A FEVER TEMPERATURE OF 40°C PROTECTS CELLS AGAINST HYPERTHERMIA-INDUCED APOPTO- SIS MEDIATED BY DEATH RECEPTOR SIGNALLING	150
ARTICLE 2: REGULATION OF HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS BY STRESS-ACTIVATED MAP KINASES AND MILD THERMOTOLERANCE IN HELA CELLS	207
ARTICLE 3: HEAT SHOCK INDUCES APOPTOSIS MEDIATED BY THE ENDOPLASMIC RETICULUM: PROTECTIVE EFFECT OF THERMOTOLE- RANCE INDUCED AT A MILD TEMPERATURE OF 40°C.....	288
CHAPITRE X : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	365
RÉFÉRENCES	385
RÉFÉRENCES	386
ANNEXE: BETTAIEB A, AVERILL-BATES DA. THERMOTOLERANCE INDUCED AT A MILD TEMPERATURE OF 40 DEGREES C PROTECTS CELLS AGAINST HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS.....	502

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Représentation schématique des différentes étapes du cancer.....	11
Figure 2.1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.....	39
Figure 2.2 : Représentation schématique des différentes voies moléculaires de l'apoptose...	44
Figure 2.3 : La voie des récepteurs de mort Fas et TNF-R1.	46
Figure 2.4 : Représentation schématique de la voie mitochondriale de l'apoptose.	49
Figure 2.5 : Classification des membres de la famille de Bcl-2.....	52
Figure 2.6 : Représentation schématique des mécanismes d'interaction entre les.....	53
divers membres de la famille Bcl-2.....	53
Figure 2.8 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des caspases.	60
Figure 2.9 : Représentation schématique de l'activation de la cascade de caspases.....	61
Figure 2.10 : Représentation schématique de l'apoptose induite par un stress du	67
réticulum endoplasmique.	67
Figure 2.11 : Représentation schématique du rôle du calcium dans la régulation des	72
fonctions cellulaires et l'apoptose.	72
Figure 2.12 : Représentation schématique du rôle des calpaïnes.	76
Figure 2.13. Rôle de AIF dans l'apoptose.....	78
Figure 2.14 : Représentation schématique des protéines IAP.	80
Figure 3.1 : Schéma représentatif des protéines kinases.	83
Figure 3.2 : Schéma général de l'implication d'ERK dans l'apoptose.	96
Figure 4.1 : Représentation schématique du rôle de la protéine p53 dans la régulation des	
fonctions des protéines Bcl-2.	107
Figure 4.2 : Représentation schématique de l'hétérogénéité des voies de signalisation utilisées	
par la protéine p53.....	108
Figure 5.1 : Représentation schématique du rôle des HSPs dans la régulation de.....	117
l'apoptose.	117

Article 1:

Figure 1: Induction of Hsps by mild heat shock at 40°C	184
--	-----

Figure 2: Thermotolerance at 40°C protects cells against heat shock-induced externalization of phosphatidylserine	185
Figure 3: Mild thermotolerance protects cells against hyperthermia-induced FADD translocation	186
Figure 4: Thermotolerance at 40°C inhibits heat shock-induced caspase-8 activation	189
Figure 5: Hyperthermia increases Fas ligand expression	192
Figure 6: Heat shock causes Bid cleavage: protection by thermotolerance at 40°C	193
Figure 7: Thermotolerance at 40°C inhibits hyperthermia-induced Bax translocation to mitochondria	194
Figure 8: Mild thermotolerance inhibits heat shock-induced cytochrome c release	195
Figure 9: Hyperthermia activates caspases-9 and -3: inhibitory effect of mild thermotolerance	196
Figure 10: Thermotolerance decreases hyperthermia-induced cleavage of PARP and ICAD	200
Figure 11: Thermotolerance at 40°C protects cells against heat shock-induced chromatin condensation	203
Figure 12: Heat shock increases ROS generation in HeLa cells	205
Scheme 1: Summary of protective effect of mild thermotolerance against activation of death receptor-mediated apoptosis by hyperthermia in HeLa cells.	206

Article 2:

Figure 1: Heat shock induces ROS generation	251
Figure 2: Heat shock induces Daxx and ASK-1 translocation to plasma membrane	252
Figure 2: Heat shock induces binding of Daxx and ASK-1 to FasR	254
Figure 2: Heat shock induces binding of Daxx and ASK-1 to FasR	254
Figure 2: Purity of fractions	255
Figure 3: Heat shock induces JNK phosphorylation	256
Figure 3: Heat shock induces c-Jun phosphorylation	257
Figure 4: Heat shock induces Bax translocation to mitochondria	259
Figure 5: Heat shock induces loss of MMP	260
Figure 5: Heat shock induces cytochrome c release to the cytosol	261

Figure 6: Heat shock induces caspase 3 activation	262
Figure 7: Heat shock induces chromatin condensation	263
Figure 8: Heat shock induces p38 phosphorylation	265
Figure 8: Heat shock induces p38 translocation to nucleus	266
Figure 9: Heat shock induces HSP27 phosphorylation	267
Figure 9: Heat shock induces HSP27 relocalisation to the nuclear fraction	268
Figure 9: Heat shock induces HSP27 relocalization to the microsomal fraction	269
Figure 10: Heat shock induces p38-mediated Bcl-2 degradation.....	270
Figure 11: Heat shock induces p53 phosphorylation at serine 15	271
Figure 11: Heat shock induces p53 phosphorylation at serine 46	272
Figure 11: Heat shock induces p53 relocalization	273
Figure 11: Heat shock induces p53 nuclear relocalization.....	274
Figure 12: p53 interacts with Bcl-2 and Bcl-xL but not with Bax or Bak during heat shock- induced apoptosis	275
Figure 12: Heat shock induces loss of MMP	276
Figure 12: Heat shock induces cytochrome c release to the cytosol	277
Figure 12: Heat shock induces caspase 3 activation	278
Figure 12: Heat shock induces Chromatin condensation	279
Figure 13: Heat shock induces transcriptional activity of p53	280
Figure 14: Heat shock cell cycle arrest at G1/S phase	283
Scheme 1: Summary of activation of JNK MAP kinase pathway by hyperthermia in HeLa cells.....	286
Scheme 2: role of p53 and p38 MAP kinase hyperthermia in hyperthermia-induced HeLa cells death.	287

Article 3:

Figure 1: Heat shock induces the expression of CHOP	333
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins	334
Figure 2: Purity of fractionation.....	338
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-xL family proteins.....	340
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bax family proteins	341

Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bak family proteins	342
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bik family proteins	343
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bim family proteins	344
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Puma family proteins	345
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Noxa family proteins	346
Figure 2: Heat shock induces relocalization of Noxa family proteins	346
Figure 3: Heat shock induces disruption of calcium homeostasis	347
Figure 4: Heat shock induces calpastatin cleavage	348
Figure 5: Heat shock induces cleavage of calpain and its translocation to plasma membrane	349
Figure 5: Heat shock induces calpain activity: role of calcium	351
Figure 6: Heat shock induces Vinculin cleavage	352
Figure 7: Heat shock induces calcium dependent disruption of mitochondrial membrane potential	353
Figure 8: Heat shock induces cleavage of caspase 4 and 12	354
Figure 9: Heat shock activates caspases 4 and 12: role of calcium	355
Figure 9: Heat shock activates caspase 7	356
Figure 10: ASK-1 and Traf-2 are not required for activation of caspase 4 and caspase 12 ..	357
Figure 11: Calcium does not mediate caspase 3 activation	360
Figure 12: Heat shock induces chromatin condensation	361
Scheme 1: Heat shock alters the proapoptosis-antiapoptosis balance in Bcl-2 family proteins.	364

Conclusion:

Figure 10.1: Test de cytotoxicité	383
Figure 10.2: le choc thermique induit la condensation de la chromatine	384
Figure 10.3: Mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose par le choc thermique chez des cellules HeLa	384
Figure 10.3: Mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose par le choc thermique chez des cellules HeLa	385

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Liste des différents membres de la famille des caspases.....	57
Tableau 2.2 : Gènes induits par la réponse UPR.....	64
Tableau 3.1 : Liste des différents substrats des MAP kinases.....	84
Tableau 5.1: Liste des principales protéines du choc thermique.....	110
Tableau 7.1 : Liste des différentes espèces oxygénées.	129
Tableau 7.2 : Liste des différents antioxydants.....	130

Article 2:

Table 1: Heat shock induces cell cycle arrest	285
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
ANT	Transporteur adenine nucléotide
APAF	Facteur d'activation des protéases apoptotiques
Apo	Apolipoprotéine
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BIR	baculovirus <i>iap</i> repeat
BH	Bcl-2 homology
BSA	Albumine sérique bovine
Ca	Calcium
CAD	Désoxyribonucléase activée par des caspases
CARD	Domaine de recrutement de la caspase
CDK	Kinase dépendante de cycline
Ced	" <i>Cænorhabditis elegans</i> death"
COX	Cyclooxygénase
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
D.O. λ	Densité optique à la longueur d'onde λ
DED	Domaine effecteur de la mort cellulaire
Diablo	Facteur de liaison directe aux protéines IAP à faible pI
DISC	Complexe inducteur de signal de mort

DVED-AMC	Peptide Asp-Glu-val-Asp lié au 7-amino-4-méthyle-coumarine
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EOR	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	Domaine de mort associé à la protéine Fas
GDP	Guanosine di-phosphate
Glu	Glutamate
GSH	Glutathion réduit
GTP	Guanosine tri-phosphate
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HSPs	Protéines de choc thermique
IAP	Inhibiteurs des protéines apoptotiques
ICE	Enzyme de conversion de l'interleukine 1 bêta
IGFs	Facteurs de croissance analogues à l'insuline
JIP	Protéine qui interagit avec JNK
JNK	Kinase de la partie aminoterminal de la protéine c-Jun
KSR	Protéine kinase suppresseur de RAS
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Protéine activée par les mitogènes
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MAPKK	Protéine kinase kinase activée par les mitogènes
MEK	MAP/ERK kinase
MKK	MAP kinase kinase
MKP	MAP kinase phosphatase
MP-1	Partenaire de MEK-1-1
MSK	Kinase activée par les mitogènes et les stress

NGF	Facteur de croissance neuronale
PARP	Poly-ADP-ribose polymérase
PBS	Tampon phosphate salin
PI	Iodure de propidium
PMSF	Phenylmethyl sulfonide fluoride
RLO	Radicaux libres oxygénés
SAPK	Protéine kinase activée par les stress
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
Ser	Sérine
Smac	Facteur mitochondrial d'activation secondaire des caspases
TGF	Facteur inhibiteur de croissance
TGF-β	Facteur de croissance tumorale bêta
TM	Domaine transmembranaire
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAF-2	TNF receptor associated factor-2
U.V.	Ultraviolet
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire
VIH	Virus de l'immuno-déficiência humaine
α-MEM	Milieu minimum essentiel alpha
$\Delta\Psi_m$	Différence de potentiel de la membrane mitochondriale

RÉSUMÉ

Il est généralement admis que l'expertise scientifique et technique des laboratoires de recherche ainsi que l'expertise médicale des services cliniques contribuent toutes à mieux connaître et à améliorer la santé de l'homme en favorisant les interfaces entre recherche fondamentale et recherche médicale cognitive et clinique. Ce présent projet vient soutenir cette contribution en soutenant l'intégration de l'hyperthermie comme possibilité thérapeutique dans la lutte contre le cancer au sein des établissements de santé canadiens. Ce travail de recherche comprend deux volets. En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la toxicité du choc thermique et à sa capacité d'induire différentes voies de signalisation de l'apoptose. En second lieu, nous avons évalué l'effet protecteur de la thermotolérance induite à des températures douces contre la toxicité d'un choc thermique subséquent létal. Plus précisément, nous avons étudié les mécanismes moléculaires d'induction de la voie des récepteurs de mort Fas par le choc thermique (1), ainsi que la tendance du choc thermique à activer les voies de signalisation cellulaire impliquant les protéines MAP kinases et la protéine p53(2) et à générer un stress du réticulum endoplasmique (3). Dans les trois chapitres de l'étude, nous avons également investigué le rôle de la thermotolérance et des protéines de choc thermique dans la protection des cellules contre l'induction de l'apoptose par l'hyperthermie létale. L'exposition des cellules à des températures élevées létales (42-45°C) a conduit les cellules vers une mort majoritairement apoptotique. Les trois voies de l'apoptose (voie mitochondriale, voie du récepteur de mort Fas et voie du RE) ont été induites. Cependant, l'inhibition spécifique de la voie du récepteur de mort Fas nous a permis de conclure que cette dernière était responsable de l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose médiée par la mitochondrie. Pour sa part, la voie du réticulum endoplasmique (RE) est induite suite à un stress prolongé du RE. Il s'est avéré aussi que l'induction de cette voie n'est pas indispensable pour l'induction de l'apoptose par choc thermique létal. Durant ces cascades signalétiques, les MAP kinases, en particulier les protéines JNK et p38, jouent un rôle crucial dans la phosphorylation et l'activation de divers facteurs pro-apoptotiques tels que Bax, Puma, Noxa et p53. Ceci a conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/S, et à la translocation de Bax à la mitochondrie et la dégradation de Bcl-2. D'autre part, suite à l'induction de la thermotolérance à la température de la fièvre (40°), nous étions capables de protéger les cellules contre la cytotoxicité d'un choc thermique létal subséquent. Malgré qu'aucunes évidences n'aient été établi, cet effet protecteur de la thermotolérance semble être en parfaite corrélation avec l'augmentation du niveau d'expression des HSPs. L'utilisation conjointe de l'hyperthermie létale et non létale (la thermotolérance) pourrait constituer une possibilité à envisager lors du traitement du cancer par les méthodes classiques. La pertinence et l'originalité de ce projet réside dans le fait que cette alternative est avant tout naturelle et biologique, peu coûteuse, et exemptée de la plupart des effets secondaires observés lors de l'utilisation des méthodes classiques de traitement, qui sont généralement toxiques et coûteuses.

Mots clés : Hyperthermie, HSPs, Thermotolérance, Apoptose, Nécrose, Caspases, Calcium, ROS, Bcl-2, Fas, Mitochondrie, Réticulum Endoplasmique, p53, MAP kinases, Calpaïnes

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE CANCER

1.1 Le cancer : histoire et regards portés sur la maladie

Le cancer n'est pas une maladie nouvelle, loin de là. Le cancer existe fort probablement depuis l'origine de la vie, aussi bien chez les plantes que chez les animaux. Les premières descriptions connues du cancer datent de la haute Antiquité. En effet, des cancers osseux ont été décelés dans des restes de dinosaures vieux d'environ 80 millions d'années. De plus, un cancer osseux de l'humérus a été mis en évidence sur un guerrier de l'âge de fer (10 000 ans av. J.-C. ; (Olson 1989)). Bien que le cancer soit bien décrit il y a environ 5 500 ans dans les premiers écrits médicaux tels que les papyrus Ebers égyptiens, les écrits mésopotamiens, indiens, et persans, la première définition de cette maladie fut attribuée par Hippocrate (Darmon 1993). Selon lui, le mot "carcinos" —qui signifie crabe en grec — évoque le crabe dévorant les tissus sains, d'où le mot "carcinome" ou "squihrrre" (dérivant de *skirros*) qui signifie une tumeur dure, non inflammatoire, avec tendance à la récurrence et à la généralisation, amenant à une mort inéluctable. On trouve également dans l'histoire grecque d'autres descriptions de cette maladie, notamment celle narrée par Hérodote pour décrire le cancer du sein d'Atossa, fille de Cyrus et femme de Darius. La traduction du mot "carcinos" en "cancer" et son introduction au latin fut réalisée par le médecin romain Celsus (28 av. J.-C.- 50 apr. J.-C.; (Auerbach 1955)).

C'est au I^{er} siècle après Jésus-Christ que l'on a commencé à définir le cancer comme un déséquilibre entre les quatre humeurs du corps ; la bile noire ou atrabile, le phlegme, le sang et la bile jaune (qui est le mélange du sang et de la bile noire). On a également introduit le mot "oncos" pour la première fois dans un écrit décrivant avec beaucoup de précision le cancer du sein. Cette terminologie, attribuée par Galien

(131-201) médecin d'Alexandrie pour désigner et décrire une grosseur ou une tumeur d'allure maligne, perdurera pendant les quinze siècles suivants. Durant cette longue période, plusieurs possibilités de traitement furent décrites et réalisées. On trouve par exemple dans l'œuvre la plus fameuse d'Ibn Sina (980 – 1037 ; connu en Occident sous son nom latin d'Avicenne), « le Canon de la Médecine », encyclopédie qui détaillait pratiquement tous les stades du traitement de toutes les maladies connues ou répertoriées, des traités dans lesquels il donnait des indications pour le traitement du cancer. Dans ces ouvrages, on trouve une description détaillée de l'intervention du médecin dès l'apparition du cancer jusqu'à l'ablation de tous les tissus atteints. Selon lui, c'était le seul espoir de guérison. Il était également parmi les premiers à classer les tumeurs en fonction des tissus atteints. Ainsi, la première description du cancer de l'œsophage et de l'estomac fut-elle réalisée par Inn Zuhr (1070-1162), connu sous le nom de Avenzoar. Lui aussi recommanda l'excision de la tumeur lorsque le cancer était en début d'évolution et situé dans une partie accessible (Freind, Coulet et al. 1727; Le Coz 2004).

Avec la renaissance au XVI^e siècle et la découverte du système lymphatique par l'anatomiste italien Gaspard Aselli (1581-1625), le cancer est vu sous un autre angle. Jean Pecquet (1622-1674) était le premier à décrire le rôle du système lymphatique dans l'évolution du cancer. Selon lui, pour prévenir les maladies métastatiques, il a fallu retirer les ganglions lymphatiques locorégionaux et se fut la meilleure solution dans la thérapie du cancer. Cependant, les affirmations de certains médecins comme Sennert (1572-1637) qui voyait le cancer comme une maladie contagieuse, choqueront la société et dès lors, on commencera à construire des hôpitaux destinés exclusivement aux cancéreux (l'Hôpital de Varsovie ; St Lazare en 1592, l'hôpital de Reims ; St-Louis en 1740 ; (Catahier and Sournia 1989)). C'est au XVIII^e siècle que les découvertes de Henri François le Dran (1685-1770) sont venues rassurer l'humanité (Le Dran and Reid 1766). Selon lui, le cancer est une maladie non contagieuse qui débute localement avant d'envahir les canaux lymphatiques pour

s'installer finalement dans les ganglions lymphatiques. À partir de cette époque, la recherche commença à avancer à pas de géants. La découverte de la notion du tissu, au niveau organique, par l'allemand Muller en 1826, des rayons X en 1895 et de la radioactivité en 1896 bouleversa les scientifiques et les amena à développer des stratégies thérapeutiques qui ne cessèrent depuis, de se perfectionner (Thomas 2001).

Le cancer est donc une maladie très ancienne parmi tant d'autres; devant laquelle les médecins étaient contraints de constater leur impuissance. Il a fallu attendre le début du XX^e siècle pour que le cancer devienne l'obsession de toute la société et que soit créée l'Union internationale contre le cancer (UICC) en 1920 (Maisin 1966).

1.2 Statistiques et faits saillants

Les pathologies cancéreuses présentent un facteur de morbidité et de mortalité majeur et en augmentation rapide dans le monde entier. Pour lutter contre le cancer, les efforts internationaux ont convergé vers la création de l'UICC. Cette approche internationale a permis de réunir des experts de divers pays, et de différentes spécialités, et a conduit à de nouvelles et intéressantes conclusions. Le but essentiel de cette organisation est l'information et la sensibilisation pour la protection de la santé humaine. Sachant qu'en moyenne 17.291 personnes meurent chaque jour selon l'UICC, le cancer est devenu une cause majeure de décès dans le monde entier. Sur un total de 58 millions de décès enregistrés au niveau mondial en 2005, 7,6 millions (soit 13 %) étaient dus au cancer. Plus de 70 % des cas de décès par cancer survenus en 2005 concernaient les pays en développement. D'après les projections, le nombre des cas de cancer devrait continuer à augmenter dans le monde. On estime que 9 millions de personnes mourront d'un cancer en 2015 et 11,4 millions en 2030. Selon la même organisation, on estime qu'au moins 40 % des cas de cancers seraient évitables par l'adoption de saines habitudes de vie (UICC 1997).

Au Canada, et selon les dernières données statistiques de la société canadienne du

cancer, le cancer est responsable de 27 % des décès, 30 % chez l'homme, 24 % chez la femme. On estime à 159 900 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués et à 72 700 le nombre de décès attribuables au cancer en 2007. Le cancer est la 1^{ère} cause de décès prématuré au Canada. Les taux d'incidence et de mortalité varient remarquablement entre les provinces: ils sont plus élevés dans les provinces de l'Atlantique et au Québec, et plus bas en Colombie-Britannique. On estime que 38 300 nouveaux cas de cancer et que 19 000 décès imputables à cette maladie surviendront au Québec en 2007 (Canadian Cancer society 2008). En plus de leur variation géographique, ces données statistiques varient également dans le temps et le nombre de nouveaux cas de cancer ne cesse d'augmenter au fil des ans. La variation touche aussi le type de cancer : selon les données statistiques publiées en 2007 de l'UICC, le cancer du poumon par exemple est plus répandu dans les pays développés (646 000 cas) que dans les autres pays (593 000 cas). Il touche moins les femmes (337 000 cas rapportés dans le monde) que les hommes (900 000 cas). Le nombre de cas de cancers du poumon à travers toute l'Europe (375 000 cas) est près du double de celui de l'Amérique du Nord (201 000 cas ; (UICC 2007)). Globalement, la fréquence des cancers augmente avec l'espérance de vie de la population considérée.

La variation dans le temps et dans l'espace est également le motif de plusieurs études et travaux s'effectuant partout dans le monde visant à déterminer les causes possibles de ces maladies; l'accent étant mis sur les facteurs qui amplifient l'incidence du cancer. Des enquêtes rétrospectives réalisées chez les sujets atteints de cette maladie ont débouché sur les principales causes de la maladie, en plus de découvrir la relation entre certains types de cancer et certaines maladies infectieuses.

1.3 Définition d'un cancer

Le cancer est une pathologie observée uniquement chez les organismes complexes. Cette propriété est due au fait que les organismes complexes possèdent des tissus renouvelables, expliquant ainsi leur susceptibilité aux cancers. Les cellules présentes

au sein du clone néoplasique émergent, acquièrent un ensemble de propriétés ne respectant pas les mécanismes qui contrôlent la croissance cellulaire et évoluent en cancer. Le cancer est donc le résultat d'une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules. Pour qu'un cancer se développe, il faut qu'il y ait eu plusieurs mutations dans le génome cellulaire. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Cependant, pour qu'elle soit cancéreuse, la cellule devrait acquérir plusieurs propriétés moléculaires typiques résultant en des caractéristiques morphologiques spécifiques à la cellule tumorale. Parmi les changements morphologiques observés, on trouve:

- 1 Les anomalies des noyaux : noyaux volumineux, multiples, nucléoles visibles, hyperploïdie (anisocaryose);
- 2 Les anomalies de la taille des cellules (hétérogénéité connue sous le nom d'anisocaryose ou anisocytose);
- 3 Les anomalies cytoplasmiques comme l'augmentation du rapport cyto-nucléaire par augmentation du contenu en acides nucléiques du cytoplasme résultant ainsi en un cytoplasme basophile;
- 4 Les anomalies de la membrane cytoplasmique : perte de l'inhibition de contact, modification de l'adhésivité, modifications des antigènes de surface, la multiplication et l'empilement des couches cellulaires (Macdonald, Ford et al. 2003).

Suite à ces anomalies, la cellule cancéreuse acquiert d'autres propriétés dynamiques caractérisées par un taux élevé de mitoses anarchiques, indéfinies et incontrôlées. Sur le plan phénotypique, une cellule cancéreuse a les propriétés suivantes : une perte de l'inhibition de contact et de la dépendance vis-à-vis de l'ancrage, une indépendance par rapport aux facteurs de croissance, l'immortalité, l'acquisition des propriétés destructrices locales ou de stimulation, à leur profit, des mécanismes normaux du remodelage et la tumorigénicité qui comporte elle-même

plusieurs étapes différentes (Mendelsohn 1995). Pour donner lieu à un cancer, la cellule devrait passer par un processus de cancérogenèse se résumant en sept étapes décrites ci-après.

1.3.1 L'initiation

Un cancer peut être initié par une multitude d'agents cancérogènes, tels que les produits chimiques, les virus et les radiations. Leurs mécanismes d'actions sont multiples et amènent généralement à des modifications d'une ou plusieurs séquences du génome cellulaire par des mutations, délétions, réarrangements structuraux, amplifications géniques, ou encore une dérégulation de l'expression et une déstabilisation de l'ARN_m (Sherbet and Lakshmi 1997). L'initiation consiste donc, en une dérégulation génomique (multiples événements mineurs) aboutissant à une dérégulation majeure. Il en résulte une transformation cellulaire. Cette étape cible les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes, les gènes de réparation de l'ADN et le programme de mort cellulaire.

1.3.2 La promotion

La promotion est un phénomène potentiel qui survient suite à l'exposition de façon répétée pendant une longue durée à l'agent promoteur de carcinogenèse. Cette étape consiste en une prolifération plus ou moins contrôlée des cellules initiées en processus d'acquérir les caractéristiques lui permettant de générer un cancer. Elle résulte d'un faisceau d'interactions entre cytokines (facteurs de croissance) et leurs récepteurs, ce qui amène à la perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformés. Parmi les agents promoteurs de carcinogenèse, on cite ; la nutrition et les habitudes alimentaires (l'alcool et le tabagisme), les infections virales et bactériennes, les traumatismes répétés, les hormones (principalement pour les cancers hormono-dépendants) et l'âge, compte tenu du nombre important de divisions cellulaires associé à l'inefficacité des mécanismes de réparation des

dommages à l'ADN (King 1996).

1.3.3 La progression

C'est une prolifération incontrôlée des cellules tumorales suite à laquelle le cancer devient cliniquement détectable à cause de l'extension du nombre des cellules à plus de 10^9 cellules. Cependant, du fait du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmacorésistance. Durant la progression, une perte de fonction caractérise les cellules cancéreuses qui deviennent alors incapables d'effectuer leurs fonctions normales au sein d'un tissu (Figure 1.1). De même, l'instabilité génétique conduit les cellules cancéreuses à l'acquisition de nouvelles propriétés d'indépendance et de nouvelles caractéristiques fonctionnelles. La tumeur, à ce stade d'évolution du cancer, comporte 3 compartiments cellulaires : les cellules souches en division, les cellules quiescentes et les cellules incapables de se diviser et qui finiront par mourir. Seules les cellules du premier compartiment, et qui sont dotées de pouvoir d'autoreproduction, sont potentiellement dangereuses. Il ne s'agit encore que d'un stade du cancer 'in situ' couramment appelé cancers intra-épithéliaux (Liotta 1992).

1.3.4 La désorganisation tissulaire et le phénomène invasif

C'est le pouvoir que les cellules cancéreuses acquièrent lors de leur prolifération incontrôlée. Les cellules acquièrent les propriétés nécessaires qui leur permettront d'infiltrer les tissus dans lesquels elles se développent. Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses ne respectent plus les relations structurelles tissulaires et infiltrent puis envahissent les tissus voisins. Le mécanisme le plus important dans l'invasion tumorale est la perte d'adhésion des cellules entre elles. En effet, la perte ou la modification des glycoprotéines de surface membranaire, assurant normalement la reconnaissance des cellules d'un même tissu, les unes par rapport aux autres, et la constitution d'épithéliums bien organisés, empêchent la congruence des

cellules entre elles et préparent les cellules cancéreuses à traverser les membranes basales. Les membranes basales sont les structures qui séparent les couches cellulaires de surface et le tissu conjonctif (tissu de soutien). Les cellules cancéreuses détournent à leur profit, soit directement, soit en stimulant les cellules voisines, les mécanismes normaux de remodelage du tissu conjonctif (Figure 1.1). Elles perdent leur cohésion et essayent de dissoudre les membranes basales, soit par elles-mêmes, soit par la stimulation des cellules mésenchymateuses avoisinantes, cela afin d'envahir les tissus voisins (Information Retrieval 1980; McKinnell 1998; Weinberg 1998). L'invasion tumorale se fait préférentiellement le long des zones éprouvant la moindre résistance. La rupture et le franchissement de la membrane basale représentent un critère formel pour distinguer les cancers invasifs des cancers *in situ*. Durant ce stade, les cellules vont également acquérir une certaine mobilité pour s'approcher des vaisseaux sanguins (Sherbet and Lakshmi 2008).

1.3.5 L'angiogenèse et la "stroma-réaction"

Une fois les membranes franchies, les cellules cancéreuses ont accès aux vaisseaux du tissu conjonctif (artères, veines lymphatiques) et aux organes adjacents. La sécrétion de facteurs impliqués dans l'angiogenèse et de facteurs protéolytiques durant cette étape permet aux cellules cancéreuses de constituer leur propre réseau de capillaires nourriciers indispensables à leur prolifération (Figure 1.1) (Hayat 2008). La stimulation des cellules endothéliales des capillaires voisins par les cellules cancéreuses permet de former des boucles vasculaires en leur direction, pour l'apport en nutriments et en oxygène. La séquence d'événements mis en jeu durant le processus d'angiogenèse se résume comme suit : vasodilatation et déstabilisation de la paroi vasculaire ; dégradation de la matrice extracellulaire ; prolifération et migration des cellules endothéliales (Chelsea 2008; McCarthy 2008). Les cellules cancéreuses vont également stimuler les cellules mésenchymateuses normales, aboutissant à ce qu'on appelle la 'stroma réaction' qui permet le développement d'un

tissu de soutien non cancéreux à la tumeur et qui est nécessaire à sa survie. Le stroma est constitué de cellules conjonctives normales, de fibres de collagène et élastiques, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et même de nerfs. Dans certaines tumeurs, notamment dans le cas des cancers endocriniens différenciés ou des carcinomes hépatocellulaires, le stroma s'adapte à la différenciation de la tumeur et prend un type endocrine (Berstein and Santen 2008).

1.3.6 Les métastases ganglionnaires

Ce qui fait la gravité du processus cancéreux, c'est le développement de métastases. Ce développement est la conséquence logique de l'invasion locale décrite précédemment. Les mêmes mécanismes sont utilisés par les cellules cancéreuses pour envahir les vaisseaux lymphatiques et sanguins et ainsi induire la formation de métastases à distance. Le drainage lymphatique des tissus normaux explique leur envahissement rapide par les cellules cancéreuses (Figure 1.1). Celles-ci sont emportées par le courant lymphatique vers les sinus corticaux du premier relais ganglionnaire. L'arrivée des cellules cancéreuses dans les ganglions est souvent accompagnée d'un 'état réactionnel', sous forme de lymphadénite chronique non spécifique (Fajardo, Geller et al. 1982). Les cellules cancéreuses vont être soit détruites, soit survivre aux stress. Dans ce dernier cas, elles peuvent se fixer aux parois en restant quiescentes, ou se multiplier pour donner une métastase ganglionnaire palpable. Les cellules cancéreuses peuvent également soit traverser le ganglion pour gagner les relais ganglionnaires suivants, soit infiltrer tout le trajet des vaisseaux lymphatiques occasionnant ainsi une lymphangite carcinomateuse. La voie de dissémination lymphatique est la plus fréquente. Elle concerne tout particulièrement les tumeurs malignes épithéliales ou carcinomes (August, Sugarbaker et al. 1985).

1.3.7 Les métastases sanguines

Les cellules cancéreuses peuvent emprunter la circulation veineuse directement ou suite à l'envahissement des voies lymphatiques jusqu'au cœur, d'où elles sont renvoyées vers de multiples organes (Figure 1.1). La dissémination hématogène des cellules cancéreuses est particulièrement fréquente pour les sarcomes, ainsi que pour de nombreux carcinomes touchant plusieurs organes (des poumons, colorectal, de l'estomac, rénal, de la prostate, endocrinien) avec des localisations préférentielles des métastases selon le type d'organe malade. Ces préférences s'expliquent soit par le drainage habituel de l'organe atteint (le foie par voie portale pour un cancer colique), soit par la présence de glycoprotéines spécifiques d'adhésion des cellules cancéreuses aux capillaires des organes cibles (exemple de l'os dans le cancer de la prostate). Certains cancers, comme celui de la peau, n'ont pas de métastases. D'autres, au contraire, en produisent très souvent : c'est le cas par exemple des cancers du sein, de la thyroïde, des bronches ou de la prostate (Barinaga 1997; Dennis, Granovsky et al. 1999; Swanson and University of Nebraska Medical Center. Dept. of Pathology and 2007).

Outre la dissémination hématogène et la dissémination lymphatique, les oncologistes ont décrit deux autres modes de dissémination, à savoir la dissémination par voie caverneuse, connue aussi sous le nom de voie séreuse (cancer de l'ovaire, cancer du colon) et la dissémination anatomique le long des conduits naturels par voie canalaire (uretère, vessie). Une dernière voie de dissémination par le liquide céphalorachidien a été reconnue responsable des métastases leptoméningées ou des métastases dans les ventricules.

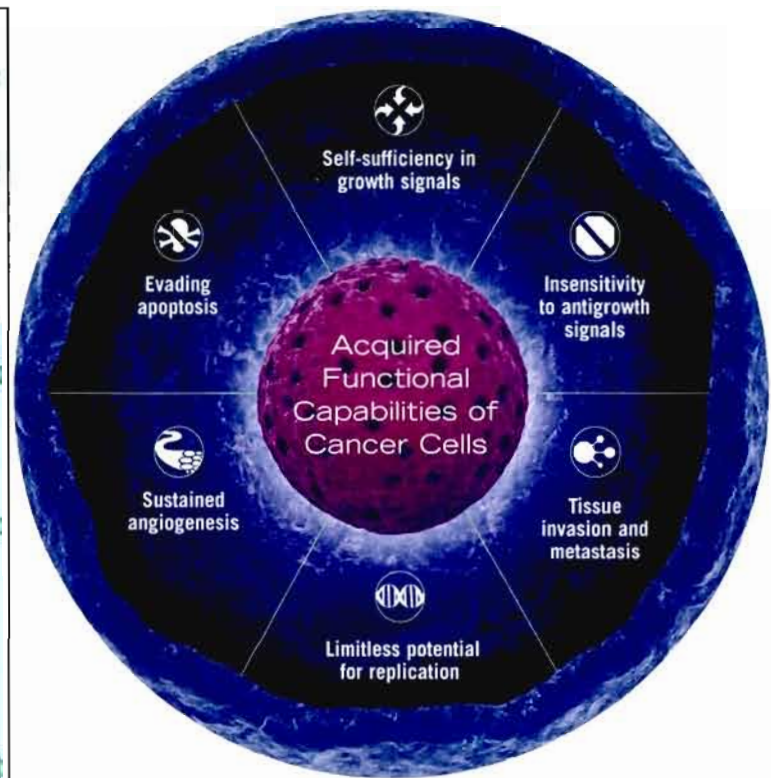
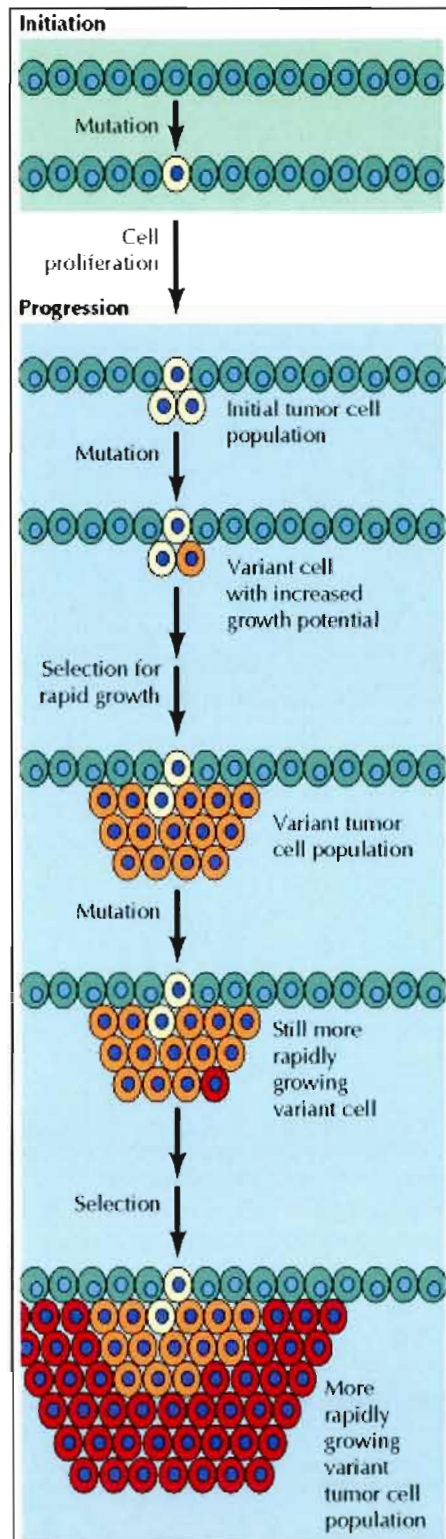


Figure 1.1: Représentation schématique des différentes étapes du cancer. Le cancer est défini comme étant des cellules anormales qui se multiplient de façon incontrôlée. Elles finissent par former une masse qu'on appelle tumeur maligne. Le cancer peut être infiltrant ou in situ. En cas de cancer infiltrant, les cellules infiltrant les tissus soutenant la tumeur et présentent un risque théorique de métastases (A). On peut distinguer, schématiquement, six étapes dans la genèse d'un cancer, dont les deux premières sont connues uniquement par les modèles expérimentaux et l'étude de l'épidémiologie des tumeurs humaines (B). L'initiation correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral, etc.), la promotion qui survient suite à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée et enfin, la progression qui correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique (Figures adaptées de Cooper (1997))

1.4 Facteurs de risques

Les facteurs de risque les plus fréquemment évoqués sont ceux liés à l'environnement (produits toxiques utilisés dans la vie quotidienne, pratiques professionnelles) et à des comportements individuels (alcool, tabac, sédentarité, alimentation). Ces facteurs de risque ne conduisent pas forcément à la formation de cancer. Une augmentation du nombre de cancers a simplement été constatée chez les personnes concernées. Dans une étude publiée par des chercheurs de l'université Harvard, sur les sept millions de décès liés au cancer chaque année, 2,43 millions ont été causés par neuf facteurs de risque comportementaux et environnementaux. Ces neuf facteurs de risque sont le surpoids et l'obésité, une faible consommation de fruits et légumes, l'inactivité physique, le tabagisme, la consommation d'alcool, les relations sexuelles non protégées, la pollution de l'air urbain, la fumée intérieure due à l'utilisation domestique de charbon et enfin les pathologies transmises dans les hôpitaux par l'utilisation de matériel injectable souillé (Danaei, Vander Hoorn et al. 2005). Chaque année, ces neuf facteurs causent environ 1,6 millions de décès par le cancer chez les hommes et 830 000 chez les femmes (Danaei, Vander Hoorn et al. 2005). Selon cette étude, il s'avère que l'alcool et le tabac sont les deux facteurs les plus redoutables dans la plupart des régions du monde. Le tabagisme serait à lui seul responsable de 21 % des décès par le cancer. Dans cette partie du chapitre, les facteurs de risques seront classés en fonction de leurs menaces potentielles pour la santé humaine (Gandini, Botteri et al. 2008).

1.4.1 Facteurs non modifiables

L'âge, le sexe et l'hérédité représentent des facteurs de risque de cancer non modifiables ni évitables, d'où leur dangerosité.

1.4.1.1 L'âge

Le risque de souffrir d'un cancer augmente avec l'âge : une majorité de cancers est diagnostiquée entre 50 et 70 ans (Guarente, Partridge et al. 2008). Le cancer est d'abord lié à l'âge. Il est moins fréquent avant l'âge de 35 ans (bien qu'il soit la 2^{ème} cause de mortalité chez l'enfant et chez le jeune adulte après les morts violentes accidentelles). Sa fréquence augmente régulièrement après l'âge de 35 ans et cela est souvent lié à une exposition prolongée et répétée aux cancérogènes au niveau de l'organe touché par la maladie. La mortalité due au cancer est aussi plus importante chez les personnes âgées (UICC 2007).

1.4.1.2 Le sexe

Certains types de cancer sont plus fréquents chez l'homme que chez la femme, ou inversement. Tout dépend de l'anatomie, car certains types de cancer ne sont diagnostiqués que chez un sexe en particulier. D'autres types de cancer sont plus fréquents chez un sexe en particulier à cause des habitudes alimentaires et sanitaires, des conditions de travail ou de l'attitude comportementale (Roxanne 2007).

1.4.1.3 L'hérédité

La génétique de la prédisposition au développement de tumeurs est longtemps restée une curiosité médicale. Plusieurs débats sont engagés dans un éventail sur le rôle de l'hérédité dans la survenue des cancers et sur le rôle de certaines maladies dans l'augmentation des risques d'atteinte par le cancer. Le risque de cancer du côlon est plus élevé lorsqu'un cancer a déjà été diagnostiqué dans la famille proche (parents, fratrie, enfants), surtout si ce cancer est apparu jeune. De plus, certaines maladies familiales entraînent un risque majeur de cancer du côlon. Il s'agit en particulier de la polyposie adénomateuse familiale, qui se caractérise par l'apparition précoce de polypes multiples sur tout le côlon (Hadley 1967), et du syndrome de Lynch (Truta,

Chen et al. 2008). Ces anomalies se transmettent le plus souvent sur le mode dominant. On trouve également d'autres syndromes et cancers souvent associés à l'hérédité, entre autres : le syndrome de Li-Fraumeni associé au cancer du sein (Searles Nielsen, Mueller et al. 2008), aux sarcomes (Khoury 2008), mais également à des hémopathies malignes (Hadley 1967), des tumeurs cérébrales et des corticosurrénales (Benailly, Schweisguth et al. 1975). Le syndrome de Cowden, lui aussi, est une forme de cancer familial associé à de nombreuses tumeurs bénignes (goitres thyroïdiens, fibro-adénomes gastro-intestinaux, léiomyomes utérins, lipomes, fibro-adénomes mammaires et aux cancers thyroïdiens (Hunt 2008). Finalement, les cancers endocriniens, comme la néoplasie endocrine multiple de type II, représentent une autre forme de cancer familial héréditaire (Hunt 2008).

1.4.2 Facteurs modifiables

La deuxième famille de facteurs de risque regroupe tous les agents chimiques et physiques à activité cancérogène et mutagène, ainsi que tout autre facteur contrôlable sans qu'il soit nécessairement un facteur à activité cancérogène ou mutagène.

1.4.2.1 L'obésité

Les données brutes dans les différents pays montrent une relation évidente entre l'obésité et certains types de cancer, en particulier les cancers du rectum, de l'endomètre et du côlon. On suspecte également l'influence de l'obésité dans le cancer de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme. Ces cancers représentent les principaux cancers occidentaux non liés au tabac (UICC 2007). Environ 3 % des nouveaux cas de cancers aux états unis sont liés à l'obésité (Calle 2007). Jusqu'à aujourd'hui, peu d'information est retenue sur les liens directs entre l'obésité et la survenue de certains cancers, et la plupart des études se sont fondées sur des relations de corrélation sans pour autant nier l'importance de l'environnement cellulaire dans la détermination de l'incidence des cancers (21). Certaines études ont

pu proposer des méthodes systématiques de criblage de substances potentiellement cancérogènes synthétisées par l'organisme chez des personnes obèses (Benzopurène, Nitrosamines, Alcool). Elles incitent également à spéculer sur l'accroissement exponentiel de la probabilité d'apparition de cancer chez les patients ayant des problèmes de surpoids. Une étude publiée en 2003 dans l'*American Journal of Epidemiology*, et menée par l'Agence du cancer de la Colombie-Britannique, l'Université de la Colombie-Britannique et celle de l'État de Washington, a montré que les femmes qui souffraient d'obésité abdominale et qui étaient dans leur postménopause risquaient nettement plus de mourir du cancer du sein que d'autres femmes (Borugian, Sheps et al. 2003). Une autre étude publiée dans le journal *New England Journal of Medicine* et menée sur un total de 900 000 américains, dont 400 000 hommes et 500 000 femmes, et étalée sur une période de 16 années, a montré que les personnes faisant partie de la catégorie de poids la plus élevée ont une probabilité d'avoir un cancer mortel augmentée de 52 % pour les hommes et de 62 % pour les femmes (Calle 2007).

1.4.2.3 L'alimentation et le cancer

Plusieurs études ont démontré que le risque de cancer diminue si on diminue l'apport calorique (Irigaray, Newby et al. 2007; Thiebaut, Kipnis et al. 2008). Les mêmes études ont montré que les animaux de faibles poids sont plus résistants aux radiations et aux carcinogènes chimiques. Une étude publiée en 2006 vient renforcer ces résultats et a démontré qu'une alimentation trop riche en calories entraîne une puberté précoce qui favorise le cancer du sein (Kimura and Sumiyoshi 2007; Ryan-Harshman and Aldoori 2007). D'autres études effectuées sur des animaux de laboratoire ont montré qu'un régime trop riche en graisses (surtout les graisses animales) entraîne un risque de cancer beaucoup plus élevé qu'une alimentation saine (Beliveau and Gingras 2007; Kimura and Sumiyoshi 2007; Ryan-Harshman and Aldoori 2007). Dans certaines études menées au Japon, on suspecte que les acides

biliaires peuvent avoir un rôle dans l'apparition du cancer, et une corrélation fut clairement établie entre l'augmentation de la consommation de graisses et l'augmentation d'excrétion d'acides biliaires (Komichi, Tazuma et al. 2005). De même, il existe une corrélation entre cancer de la prostate et consommation de graisses animales, surtout les viandes rouges qui entraînent des cancers agressifs de prostate (Karan, Thrasher et al. 2008; Kristal, Arnold et al. 2008).

Le risque potentiel de cancérogenèse liée à l'alimentation pourrait survenir dans plusieurs cas de carcinogènes alimentaires naturels tels que :

- 1 Les produits photochimiques synthétisés par les plantes comme les pesticides naturels et qui ont des propriétés mutagènes. C'est le cas des fusosimines chez le maïs qui causent le cancer de l'oesophage.
- 2 Les mycotoxines produites par les champignons (aflatoxine et fusosimines, responsables du cancer du foie et de l'oesophage, respectivement).
- 3 Les additifs traditionnels trouvés dans les salaisons : poissons salés et décomposés qui entraînent le cancer du nasopharynx et la conservation salée qui donne des cancers de l'estomac ; les poissons et viandes fumées donnent des cancers de la muqueuse de la bouche, des amygdales, du pharynx ou bien du larynx, de l'estomac et de la vessie.

La consommation de boissons alcoolisées est considérée comme l'une des principales habitudes alimentaires évitables à fort risque de cancérogenèse (Thygesen, Wu et al. 2008; Yuan and Lee 2008). La consommation d'alcool est associée à de nombreux types de cancer, notamment les cancers du pharynx, de l'oesophage (en particulier chez les gros fumeurs), du larynx et de la cavité buccale. Cette association date de 1910, lorsqu'un médecin français, nommé Lamy L, a publié une étude montrant qu'environ 80 % des sujets atteints d'un cancer de l'oesophage ou du cardia étaient des alcooliques qui buvaient surtout de l'absinthe (Lamy 1910). Le risque de cancer augmente régulièrement avec la dose d'alcool pur contenue dans les boissons alcoolisées.

Enfin, les habitudes quotidiennes de préparation des repas pourrait, elle aussi, présenter un risque potentiel de cancérogenèse; ainsi la cuisson à haute température peut-elle produire des amines aromatiques hétérocycliques et la cuisson à flamme nue produit des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Rohrmann, Zoller et al. 2007).

D'un autre côté, on a pu démontrer que les fibres jouent un rôle protecteur et qu'elles baissent le taux d'incidence du cancer (Divisi, Di Tommaso et al. 2006). Cet effet protecteur vient du fait qu'elles augmentent le volume fécal et diluent le carcinogène tout en minimisant le contact entre matières fécales et paroi colique. Les fruits et les légumes possèdent beaucoup de fibres, d'où l'importance d'en consommer beaucoup.

Il en est de même pour une alimentation riche en micronutriments tels que les vitamines (A, E, B, folates) et les minéraux (calcium, sélénium, zinc, molybdène) qui diminuent le risque d'incidence de cette maladie tout en modifiant le métabolisme des carcinogènes. Certains micronutriments ont un rôle antioxydant (vitamine E), d'autres ont un rôle immunologique (vitamines, calcium, fer qui stimulent les défenses immunitaires) et/ou un rôle de différenciation et de croissance cellulaire (Divisi, Di Tommaso et al. 2006).

1.4.2.4 Le tabac

Il est admis depuis longtemps que le tabagisme est une cause importante de cancer et qu'il explique environ 21 % de décès chez les personnes atteints de cancer (UICC 2007). Il a été démontré que l'exposition à la fumée du tabac augmente le risque de plusieurs types de cancer, notamment le cancer de la vessie, du col de l'utérus, du côlon et du rectum, de l'œsophage, du rein, du larynx, du poumon, de la cavité buccale et du pancréas (Giovino 2007; Nakajima 2007). Le nombre annuel de décès dus au tabac dans le monde devrait passer de 4,9 millions en 2000 à plus de 10 millions en 2020. En 2007, sur les 7 millions de morts attribués au cancer, le

tabagisme à lui seul est responsable du décès de 1.3 millions de personnes, occupant ainsi la première place parmi tous les facteurs de risque (UICC 2007). Ce sont les pays en développement qui sont les plus touchés par cette augmentation. Au Canada, la consommation des produits du tabac constitue la principale cause de cancer du poumon et également la principale cause des décès prématurés évitables dus au cancer.

On estime que la fumée du tabac contient plus de 4 000 substances chimiques. Ils sont présents soit dans la phase volatile, soit dans la phase solide en suspension. Cependant, la sensibilité envers ces substances varie d'un fumeur à l'autre. La majorité des produits carcinogènes se situent dans la phase solide. En outre, 43 carcinogènes ont été parfaitement identifiés. En plus des additifs ajoutés par les fabricants de tabac (arômes, et humectants), la plupart des composés toxiques de la fumée de cigarette, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les nitrosamines, les hydrocarbures hétérocycliques, le benzène-a pyrène et le polonium 210 radioactif ont un fort potentiel mutagène direct ou indirect (Radford and Martell 1975). Les nitrosamines sont les plus toxiques : on les retrouve non seulement dans la fumée inhalée par le fumeur, mais également dans la fumée externe produite par la combustion de la cigarette, éventuellement en concentration plus forte que dans la fumée inhalée. On observe un risque augmenté de cancer des voies aérodigestives supérieures chez les fumeurs. L'ampleur de ce risque dépend de leur consommation moyenne journalière et de la durée de cette habitude. Pour le cancer bronchique, qui est le plus spécifiquement lié au tabac et qui a été le plus étudié, le risque est proportionnel à la dose et à la puissance 4 ou 5 de la durée. Les effets combinés du tabac et de l'alcool sont particulièrement nocifs et ils peuvent dramatiquement amplifier le risque d'un cancer de l'œsophage (en fonction de la dose, ce risque peut être multiplié par 100) (Pelucchi, Gallus et al. 2006).

1.4.2.5 Les infections virales, bactériennes et parasitaires

Les infections virales, bactériennes et parasitaires occupent toujours une place importante en oncologie. Même si l'implication directe de certaines infections virales est bien établie, celle des bactéries (*Chlamydia*, *Helicobacter pylori*, bactéries anaérobies) reste encore méconnue et suscite plus d'intérêt (BioMed Central; Persing and Prendergast 1999; Aoki 2003). La bactérie nommée *Helicobacter*, par exemple, est connue pour provoquer des gastrites chroniques susceptibles d'évoluer en cancer de l'estomac (Axon 2007). Parallèlement, au moins cinq virus ont été impliqués dans les maladies cancéreuses. Le Virus d'Epstein Barr, par exemple, est associé à la maladie de Burkitt, à certains cancers du naso-pharynx et à certaines variétés de lymphomes (maladies de Hodgkin; (Leenman 2007)). Les virus des hépatites B et C (Bhandari, Mazumder et al. 2007; Chaparro, Sanz-Cameno et al. 2007; Leenman 2007; Steben and Duarte-Franco 2007) quant à eux, ont été associés au cancer primitif du foie (Bhandari, Mazumder et al. 2007; Chaparro, Sanz-Cameno et al. 2007; Steben and Duarte-Franco 2007). D'autre part, l'infection par le virus du SIDA est associée à une augmentation du risque de sarcome de Kaposi et de lymphome malin non Hodgkinien (Leenman, 2007). Les virus HTLV 1 et 2 (Human T leukemia Virus) sont connus pour déclencher des leucémies, alors que les papillomavirus des types 16, 18, 31 et 33 sont associés à des tumeurs malignes, notamment le cancer du col de l'utérus associé dans 90 % des cas à un papillomavirus (Steben and Duarte-Franco 2007; Angeletti, Zhang et al. 2008; Thomison, Thomas et al. 2008). Ce dernier est considéré comme la seconde cause de cancer chez la femme dans le monde.

Dans certains cas, des infections parasitaires peuvent causer un cancer. La bilharziose, par exemple, qui est due à l'infection par *Schistosoma haematobium* (Khurana, Dubey et al. 2005) des eaux de l'Afrique de l'Est est un facteur de risque pour le cancer épidermoïde de la vessie (Garba, Toure et al. 2006; King 2006).

Les virus peuvent agir par leur intégration possible dans le génome cellulaire. Le processus tumoral commence alors lorsque le pathogène cause des modifications aberrantes de l'ADN ou suite à la production de protéines interagissant avec les protéines de contrôle de la multiplication cellulaire (ex. des papillomavirus produisant des protéines détruisant la protéine p53). Les virus peuvent également apporter des oncogènes dans leur acide nucléique. De plus, Il est admis que l'excès d'immunosuppression causé par des infections virales augmente le risque de cancer (cas du VIH) (Akanmu 2006).

1.4.2.6 Exposition aux rayons solaires et aux radiations

Tous les rayonnements sont susceptibles de provoquer des mutations émergeant sur des cancers. Le rayonnement solaire est un agent cancérigène reconnu chez l'humain ; il est à l'origine de toutes les formes de cancer de la peau, responsables d'environ 2.0 % de décès chez les personnes atteints d'un cancer (Glanz, Buller et al. 2007; Peharda, Gruber et al. 2007). Les cancers de la peau sont les cancers les plus fréquents causés par les radiations. Les mélanomes malins sont des cancers cutanés plus rares mais plus graves ; ils peuvent guérir définitivement si le traitement est mis en oeuvre précocement.

Les radiations ionisantes, quant à elles, proviennent d'un gaz radioactif, le radon, et sont émises soit naturellement par l'écorce terrestre, soit artificiellement par la radiologie médicale et les déchets nucléaires. À fortes doses, les radiations ionisantes sont responsables de modifications de l'ADN, telles que des mutations, des ruptures et des transpositions. Elles se traduiront par un cancer après quelques années de latence. Les leucémies, les cancers du poumon, de la thyroïde, de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du sein, de l'ovaire, de la vessie et des os sont les cancers les plus fréquents suite à une exposition aux radiations ionisantes (Belpomme, Irigaray et al. 2007; Irigaray, Newby et al. 2007).

1.4.2.7 Autres facteurs de risque modifiables liés à l'environnement et aux comportements

Parmi les autres facteurs de risque potentiellement modifiables, l'exposition à des agents cancérigènes présents en milieu de travail ou dans l'environnement augmente le risque de carcinogenèse. De nombreux agents chimiques utilisés en industrie sont cancérogènes; malheureusement, à l'heure actuelle, 3 % seulement de l'ensemble de ces substances chimiques ont fait l'objet d'une analyse de toxicité (Searle 1976; Warshawsky and Landolph 2005). Parmi ces substances, l'amiante entraîne le cancer de la plèvre et celui des poumons. Le mono-chlorure de vinyle et le benzène, quant à eux, sont connus pour provoquer des leucémies (Luch 2005). D'autres produits couramment utilisés tels que les éthers de glycol, l'aluminium, les amines aromatiques, l'arsenic, le chrome, les hydrocarbures polycycliques, le nickel, les poussières de bois ou de cuir, etc. sont fortement soupçonnés de favoriser, voire de provoquer, des cancers de l'estomac, des cancers des testicules et des leucémies (Clayson 2001; Criss 2003; Waddell 2004; Luch 2005).

Le rôle des stress chroniques est controversé. Certains scientifiques affirment que les stress chroniques affaiblissent le système immunitaire, ce qui pourrait favoriser la multiplication des cellules anormales. En outre, certains comportements quotidiens comme le grattage et les frottements excessifs, les coups répétés sont connus pour avoir un rôle dans l'apparition de certains cancers (Weinberg 2007).

1.5 Le traitement du cancer

D'une façon générale, la thérapie des maladies cancéreuses regroupe l'ensemble des possibilités qui permettent l'excision de la tumeur et la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques. On distingue ainsi deux groupes de méthodes de traitements de cancer : le premier englobe les trois méthodes classiques de traitements, à savoir la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, utilisées

seules ou en association, en fonction du stade du cancer, du degré de malignité, de la localisation et de la taille. À ce groupe, on associe deux nouvelles méthodes de traitement, à savoir l'hormonothérapie et l'immunothérapie. La chirurgie peut être curative, conservatrice ou radicale avec réparation, comme elle peut être palliative. La radiothérapie peut être curative ou palliative, en faisant appel à la radiothérapie externe, à la curiethérapie en sources scellées (c'est-à-dire sans contamination possible de l'organisme) ou à la curiethérapie en sources non scellées (exemple de l'iode 131 pour le cancer de la thyroïde). Le deuxième type de traitement des cancers regroupe toutes les méthodes alternatives, utilisées souvent en association avec les méthodes classiques pour diminuer la dose du traitement et améliorer les résultats (Téallier 1836; Arthur B Pardee 2008; Wiley-Liss 2008).

1.5.1 Les méthodes classiques

1.5.1.1 La chirurgie

Pour la plupart des cancers impliquant des tumeurs solides (ce qui exclut les leucémies et d'autres types de cancer du sang), la chirurgie joue un rôle central dans le traitement précoce. Elle a connu beaucoup de progrès ces deux dernières décennies en ce qui concerne le risque de mortalité opératoire et l'efficacité de la chirurgie. Néanmoins, beaucoup de progrès restent encore à accomplir. L'utilisation de la chirurgie dans le traitement des cancers date de la haute antiquité puisqu'on a découvert dans des papyrus, datant d'environ 3 000 à 2 000 ans av. J.-C., des descriptions de tumeurs et d'ulcères du sein traités par cautérisation. Dans un autre papyrus traitant de médecine et datant de 1552 av. J.-C. (Onuigbo 1962), on trouve des recommandations qui déconseillent d'enlever une grosse tumeur de la cuisse pour éviter des complications majeures aux patients, ce qui signifie que l'ablation de la tumeur était utilisée à l'époque.

La chirurgie consiste en l'ablation de la tumeur, partiellement (chirurgie limitée)

ou dans sa totalité (chirurgie monobloc radicale), ce qui permet de soulager les symptômes et de réduire les risques de propagation du cancer chez le patient (Auckland 2008; Lefferts, Bartels et al. 2008). De plus, la diminution de la quantité de cellules cancéreuses dans le corps accroît souvent l'efficacité des autres formes de traitement impliquant la chimiothérapie, la radiothérapie et/ou l'hormonothérapie.

L'inconvénient de la chirurgie est qu'on ne peut pas l'utiliser pour des cellules cancéreuses diffuses et présentes dans toute la circulation sanguine (Givel, Langer et al. 2007; Kavaikin 2007). De plus, l'enlèvement d'une partie de l'organe opéré (poumon, colon, estomac...) nécessite un temps d'adaptation avant de retrouver un fonctionnement normal et, dans certains cas, cela peut nuire à son fonctionnement. De plus, le risque d'infection peut être élevé chez des patients à système immunitaire fragile (Givel, Langer et al. 2007).

1.5.1.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie est l'une des principales méthodes de traitement utilisées pour éradiquer une tumeur. La découverte des agents anti-cancéreux a le plus souvent été fortuite, notamment celle des moutardes azotées ou de l'actinomycine D, lors des études visant à caractériser les effets de certains antibiotiques et agents chimiques. La chimiothérapie doit aussi beaucoup aux années 1970 et aux découvertes de biologie moléculaire, suscitées par le projet 'Cancer' du Président Nixon visant à lutter contre le cancer (Barron 2004; Faguet 2005). De nouveaux axes thérapeutiques n'utilisant plus l'atteinte cytotoxique comme moyen de guérir le patient, mais plutôt l'arrêt du développement des métastases et/ou de leur évolution ont été développés et ont réussi, à un certain niveau, à réduire considérablement le potentiel délétère des tumeurs. Le docetaxel et les combinaisons, mitoxandrone-prednisone et estramustine-étoposide approuvées au Canada pour le traitement du cancer du sein et du cancer de la prostate, respectivement, sont parmi ces nouvelles stratégies thérapeutiques (Koss 2006). D'autres stratégies sont en cours de réalisation, tel que le projet lancé en 1970 par

l'institut national de cancer de Bethesda, promettant le criblage de plus de 40000 composés d'origine synthétique ou naturelle par an sur un système de lignées cellulaires établies *in vitro* (Bruning 1985).

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques, cytotoxiques pour les cellules souches, dans le but d'arrêter ou de ralentir l'évolution de la multiplication des cellules tumorales, ainsi que de limiter ou prévenir la formation des métastases. La chimiothérapie est également utilisée pour réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie. Les antimétabolites, les alkylants, les alkylants mono-fonctionnels, le méthotrexate, les sels de platine, les nitrosurées, la mitomycine, les agents intercalants, les poisons du fuseau cellulaire (Vincalécoblastine, Vincristine, Vindésine, Vinorelbine), les taxanes (Paclitaxel, Docétaxel), les substances leurres comme les anti-pyrimidiques (5-Fluoro-Uracile, Cytosine Arabinoside, Gemcitabine, Capécitabine, Tégafur) et les anti-puriques (6 Mercapto-Purine, Thio-Guanine, Cladribine, Fludarabine, Pentostatine) sont les médicaments les plus utilisés en chimiothérapie (Le Pecq 1978). La plupart de ces agents anti-cancéreux inhibent des enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN, exerçant leur activité maximale durant la phase S. C'est le cas des anti-métabolites et des anthracyclines. Les poisons du fuseau bloquent la cellule en phase M du cycle cellulaire. Les agents alkylants, le cisplatine et la bléomycine agissent durant l'ensemble des phases du cycle cellulaire. Les agents dépendant du cycle sont des molécules qui interagissent de façon covalente avec l'ADN, alors que les molécules dépendant d'une phase en particulier du cycle cellulaire interagissent avec les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN (Germa Lluch, Segui Palmer et al. 1992; Perrot 2007; Vaughn 2007).

L'ensemble de ces molécules n'est pas dirigé sur une cible moléculaire spécifique de la cellule cancéreuse. Au contraire l'ensemble des constituants cellulaires peut être la cible des agents cytotoxiques. Certains sont plus ciblés que d'autres (l'ADN et les protéines du cytoplasme, notamment la tubuline). Les activités de la majorité des

agents chimiothérapeutiques sont liées à une différence de cinétique de croissance cellulaire entre les cellules cancéreuses et les cellules bénignes. Une importante fraction des cellules cancéreuses croît plus rapidement et sont, de ce fait, plus sensibles aux produits cytotoxiques. L'administration de ces molécules suit souvent des théories et des modèles spécifiques aux tumeurs tels que le modèle de Skipper, la théorie de Goldie-Coldman, la théorie des cellules en prolifération et la théorie de la croissance gomperzienne (Lloyd 1975; Tukagoshi 2003; Gaffney 2004). Malheureusement, la plupart des ces agents chimiothérapeutiques sont aussi cytotoxiques pour les tissus sains, surtout si la méthode d'administration est intraveineuse. Ceci explique les nombreux effets secondaires de la chimiothérapie, qui sont pour la plupart du temps tardifs et qui touchent certains organes en particulier, comme le cœur, le foie et les reins (Zelnak 2007; Gerber 2008; Srikanth, Davies et al. 2008). De plus, plusieurs types de résistance à la chimiothérapie ont été observés dans la pratique clinique et ils représentent à leur tour un grand obstacle pour la chimiothérapie. La résistance intrinsèque, la chimio-résistance acquise suite à la surexpression de protéines membranaires (la P-glycoprotéine (Pgp170) et les protéines associées à la multidrogue résistance MRP1/2) ou l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN sont des obstacles couramment rencontrés (Perez-Tomas 2006; Kappelmayer, Udvardy et al. 2007; Sauna and Ambudkar 2007).

1.5.1.3 La radiothérapie :

La radiothérapie est une méthode de traitement utilisant les rayonnements ionisants. On distingue plusieurs formes de radiothérapie, dont l'efficacité varie selon le type et la localisation de la tumeur :

- 1 La radiothérapie externe où la source d'irradiation est située à l'extérieur du patient. Les sources de cobalt et les accélérateurs linéaires d'énergie de 15 MeV ou plus sont le plus souvent utilisés pour traiter les tumeurs de la tête,

du cou ou du sein, alors que les accélérateurs à haute énergie servent pour les tumeurs peu accessibles comme les lymphomes et les tumeurs abdominales (Chang, Khuntia et al. 2007; Haffty and Wilson 2009).

- 2 La curiethérapie où les sources radioactives sont placées à l'intérieur de l'organisme. Dans ce cas, nous observons la subdivision en curiethérapie par sources scellées, la curiethérapie interstitielle (la source dans ce cas est placée dans la tumeur), la plésiocuriethérapie ou curiethérapie endocavitaire (sources placées à l'intérieur de la cavité naturelle dans laquelle se développe la tumeur) et la curiethérapie par sources non scellées (liquides utilisant l'iode¹³¹, le césium 137 ou l'iridium 192 (Hwang, Marymont et al. 2007; Lukas, Boire et al. 2007; Bilsky, Gerszten et al. 2008).

L'histoire de la radiothérapie a commencé le 8 novembre 1895, à Vienne, lorsque le professeur Röntgen a découvert les rayons émis par des décharges électriques dans un tube à essai (Tousey 1921). Cette expérience a donné naissance à la radiographie qui n'a cessé de se perfectionner pour donner par la suite un appareil capable de détruire la tumeur (Fox and Klawansky 2006). Ce fut en 1910 que la première tumeur fut soignée avec succès en utilisant le principe de radiographie développée par Röntgen (Fox and Klawansky 2006). Les rayons X furent les premières à être utilisés pour irradier la tumeur; néanmoins, en raison des dégâts énormes qu'ils pourraient causer aux tissus sains avoisinants, on a pensé à les substituer par d'autres appareils utilisant, non plus la lumière comme les rayons X et les rayons γ mais plutôt les protons. Cette idée a été avancée par Berkley et son frère en 1947, puis réalisée avec succès sur leur mère en 1954 (Umegaki 1987).

La radiothérapie vise à éradiquer localement toute trace de cancer. Elle peut être utilisée seule (permettant souvent dans ce cas une conservation des organes) ou en association avec la chirurgie (soit en pré-opératoire, mais le plus souvent en postopératoire, appliquée à la fois sur la tumeur primitive et sur les territoires ganglionnaires (Saunders and Dische 1997; Meyer, Verhey et al. 2007). Selon

l'objectif du traitement, on distingue la radiothérapie curative qui consiste à éliminer la tumeur mère ou les cellules cancéreuses restantes après ablation chirurgicale, la radiothérapie palliative qui vise à réduire la taille de la lésion, et la radiothérapie symptomatique visant à soulager des douleurs dues à des métastases ou pour prévenir la survenue de métastases.

Comme la chimiothérapie et la chirurgie, la radiothérapie peut être dangereuse en cas de complications. Les effets secondaires dépendent souvent de la zone irradiée et de la quantité de rayons administrée. La peau traversée est toujours altérée, de manière plus ou moins prononcée, et les organes profonds connaissent en général, après une période d'irritation, un état de cicatrisation plus ou moins long, d'où la nécessité d'une vigilance rigoureuse (Rubin 2008).

1.5.1.4 L'immunothérapie

L'immunothérapie anti-tumorale a connu de grands progrès ces dix dernières années. Cette méthode vise au renforcement des défenses naturelles, spécifiques ou non, de l'individu contre la tumeur (Old 1996; Guillot 2006). On distingue trois formes d'immunothérapies : l'immunothérapie passive, l'immunothérapie active et l'immunothérapie adoptive. La première, d'ailleurs la plus ancienne, consiste à injecter un ou plusieurs antigènes tumoraux (antigène de télomérase, antigènes de différenciation mélanocytaire), sous différentes formes, afin de stimuler une réponse immunitaire T *in vivo*. Cette méthode est également connue sous le nom d'immunothérapie spécifique. L'immunothérapie active repose sur la stimulation des propres défenses d'un individu pour l'aider à se débarrasser d'un cancer. Les interférons, les interleukines et les anticorps spécifiques sont utilisés lors d'une immunothérapie active pour stimuler les lymphocytes du patient contre sa propre tumeur (Old 1996; Guillot 2006).

L'immunothérapie adoptive, quant à elle, consiste à apporter au patient des

cellules immunologiquement compétentes stimulées *in vitro* (lymphocytes T). Celles-ci peuvent être transférées par une greffe de moelle à partir d'un donneur. Cette méthode est utilisée le plus souvent dans les cas de traitement des tumeurs solides. Cependant, il a été établi, dans des modèles animaux, que la thérapie adoptive des tumeurs est plus efficace si elle est précédée d'un traitement immunosuppresseur vu le risque élevé du rejet du greffon (Ludewig and Hoffmann 2005; Gallen 2006).

1.5.1.5 L'hormonothérapie

L'histoire de l'hormonothérapie date de 1941, lorsque Huggins découvre que la castration bilatérale réduit considérablement les douleurs osseuses des cancers métastatiques de la prostate (Ebacher A. 2003; Elsevier 2003; Azria, Lemanski et al. 2004). On avait observé depuis longtemps qu'il n'y avait pas de cancer de la prostate chez les hommes castrés. Cette thérapie est souvent utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hormono-dépendants, notamment le cancer de la prostate, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la thyroïde, le cancer du sein, ainsi que quelques réponses fugaces : ovaire et rein. L'hormonothérapie consiste à agir sur la production des hormones responsables de la prolifération des cellules tumorales, soit par prise de médicaments pour la supprimer temporairement, soit par ablation de l'organe sécréteur de l'hormone impliquée. La disparition de l'hormone stimulante peut également être effective suite à l'utilisation d'une anti-hormone ou à l'inhibition de la synthèse des hormones, voire d'un ou de plusieurs de ses métabolites (Bershtein, Poroshina et al. 2004).

1.5.2 Les méthodes alternatives

1.5.2.1 L'enzymothérapie

C'est une thérapie à base de combinaison d'enzymes protéolytiques jouant un rôle majeur dans le traitement biologique du cancer. L'histoire de l'enzymothérapie

revient à l'ombriologiste John Beard qui, dans son ouvrage «The Enzyme Treatment of Cancer and its Scientific Basis », décrit le suc pancréatique pourrait servir comme traitement efficace pour le cancer. Récemment, les chercheurs ont trouvé un moyen d'immobiliser ces enzymes, permettant ainsi de les protéger et de préserver leurs activités (Demers, Agostinelli et al. 2001; Averill-Bates, Cherif et al. 2005). Il s'agit d'une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse, encore expérimentale, c'est-à-dire qu'à l'heure actuelle elle ne peut pas être prescrite en dehors d'essais cliniques.

1.5.2.2 La thérapie génique

Il s'agit d'une méthode thérapeutique visant à traiter la maladie en modifiant la séquence d'ADN des gènes impliqués dans la prolifération tumorale. La modification de la séquence d'ADN se fait par l'induction d'anomalies afin d'empêcher l'expression des protéines responsables de la multiplication et de la prolifération des cellules tumorales. Cette technique consiste en l'introduction dans une cellule, dite cible, d'un matériel génétique constitué d'un gène sous la dépendance d'une séquence de régulation. Cette séquence de régulation est habituellement un promoteur. Le gène est introduit soit directement sous forme d'ADN nu, soit grâce à un vecteur, dans le génome duquel il est généralement inséré. L'expression de ce gène modifiera les propriétés fonctionnelles de la cellule. L'utilisation des virus dans cette méthode a pour but l'induction d'une expression, à long terme, des gènes thérapeutiques dans l'organisme (exemple du TNF α , gène p53...) (Lattime and Gerson 1999; Young and Kerr 2000; Bagley 2008). Cependant, dans le cas de mutations, ce qui est le cas de la plupart des cancers, il est encore très difficile d'atteindre cet objectif, car on ne sait pas encore réparer spécifiquement une lésion donnée dans un gène donné, mais cela n'empêche pas que cette possibilité thérapeutique soit très prometteuse, non seulement dans ses applications oncologiques, mais aussi dans d'autres applications cliniques. Toutefois, les chercheurs se trouvent devant des obstacles difficiles à dépasser, surtout si le vecteur utilisé est un rétrovirus car il n'est pas capable

d'infecter les cellules tumorales quiescentes (Lattime and Gerson 1999).

1.5.3 Thérapies complémentaires

Des progrès remarquables ont été réalisés dans le domaine de la médecine clinique dans le but d'éviter les effets secondaires et immunosuppresseurs des thérapies conventionnelles. En plus des possibilités thérapeutiques classiques, d'autres éventualités sont proposées par les chercheurs et les médecins. Certains d'entre eux sont en cours d'essai en clinique. On peut citer à titre d'exemple : la thérapie orthomoléculaire, la thérapie de différenciation, la galvanothérapie, la thérapie photodynamique, la thérapie anti-angiogénique, l'ozoneothérapie et l'hyperthermie (D'Auria, Ciprotti et al. 2007; Hanna, Crosby et al. 2008).

1.5.3.1 La thérapie orthomoléculaire

La thérapie orthomoléculaire consiste à optimiser l'environnement cellulaire avec un bon régime alimentaire équilibré de molécules naturelles, en particulier, les antioxydants naturels (vitamines C et B) minéraux, et huiles (Lesser 1987). La thérapie orthomoléculaire remonte au début des années 1950 alors qu'un petit groupe de psychiatres ont commencé à ajouter des doses massives de nutritifs à leurs traitements des problèmes mentaux sévères. La substance originale était la vitamine B3 (acide nicotinique ou nicotinamide), et la thérapie s'appelait la "thérapie mégavitinique." Plus tard, le programme de traitement a été étendu pour inclure d'autres vitamines, des minéraux, des hormones, et des diètes, chacune pouvant être combinée à la thérapie médicamenteuse conventionnelle et traitements d'électrochocs. Quelques centaines de médecins aujourd'hui utilisent cette approche dans le traitement d'une variété de conditions, mentales ou physiques.

1.5.3.2 La thérapie anti-angiogénique

C'est une approche qui vise la modification de la fonction des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur tout en restaurant les gènes mutés. Dans ce modèle le vecteur utilisé est un liposome cationique, le gène transféré est celui codant pour l'endostatine, l'angiostatine ou la thrombospondine. D'un autre côté, des inhibiteurs des métalloprotéinases (Marimastat, COL-3, Neovastat) et des inhibiteurs synthétiques de l'angiogenèse sont des nouveaux outils de la thérapie anti-angiogénique et leur utilisation semble être prometteuse (Khoueir 2004).

1.5.3.3 L'ozonothérapie

L'ozonothérapie a pour but de traiter différentes affections et symptômes en utilisant les propriétés chimiques de l'ozone. L'ozone est connu pour stimuler la production d'antioxydants et prévient donc les agressions cytotoxiques des radicaux libres sur les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui ralentit le développement et la progression des tumeurs (Madej, Antoszewski et al. 1995; Menabde, Natroshvili et al. 2006).

1.5.3.4 L'hyperthermie :

Dans cette courte section, on s'intéressera uniquement aux aspects cliniques de l'hyperthermie. Les aspects biochimiques et moléculaires seront désormais détaillés dans les chapitres qui suivent.

L'utilisation de l'hyperthermie remonte à la plus haute antiquité. Le rapport le plus ancien découvert jusqu'à date est celui de l'égyptien Edwin Smith qui a décrit dans son papyrus chirurgical l'effet thérapeutique de l'hyperthermie contre des lésions tumorales. L'intérêt mondial envers l'hyperthermie prends ses racines dans le premier congrès international sur l'hyperthermie en oncologie à Washington en 1975. Depuis, l'hyperthermie comme stratégie ne cesse de suscité l'intérêt des cliniciens et

des chercheurs.

Appelée aussi thermothérapie, l'hyperthermie consiste à utiliser la chaleur dans le traitement de certains cancers (cancer du cerveau, de la vessie, du rectum, de l'œsophage,...) et de pathologies urogénitales chroniques. Elle est utilisée seule ou en combinaison avec la radiothérapie, la chimiothérapie et aussi la thérapie génique. Le principe de ce traitement consiste à envoyer de la chaleur grâce à des ondes électromagnétiques jusque dans la tumeur. Les tumeurs mal vascularisées, ne sont pas capables d'évacuer la chaleur ce qui induit la mortalité des cellules cancéreuses (Basile, Biziato et al. 2008). Souvent, l'application de la chaleur aboutit aussi à l'activation de l'ensemble du système immunitaire et à la lutte contre toutes les infections dissimulées (Pritchard and Health Research Inc Buffalo; Manjili, Wang et al. 2002). Pour atteindre cet objectif, plusieurs appareils ont été conçus. De nos jours, les médecins ont recours à des appareils capables de chauffer seulement les régions cibles, c'est-à-dire des appareils à infrarouges, à micro-ondes ou aussi la perfusion thermique. On distingue ainsi l'hyperthermie globale, l'hyperthermie superficielle, l'hyperthermie profonde locorégionale, la perfusion hyperthermique interstitielle et la thermothérapie par hautes fréquences (Habash, Bansal et al. 2006).

Les essais cliniques de phase 1 et 2 montrent que l'hyperthermie possède un puissant effet thérapeutique dans le traitement des tumeurs de la tête et du cou, du sein, du cerveau, de la vessie, du col de l'utérus, le rectum, du poumon, de l'œsophage, de la vulve et du vagin, et des mélanomes (Van Der Zee ; 2002). Toutefois, l'efficacité de ces essais semblent dépendre de la température. En général, des températures élevées de l'ordre de 44°-45°C sont souvent requises. Selon Averbeck et ses collaborateurs, des essais cliniques de phase 1 et 2 associant l'hyperthermie à la radiothérapie et/ou à la chimiothérapie à l'Institut Curie pour le traitement des tumeurs profondes en utilisant des applicateurs d'ultrasons (13,56 MHz) ont donné des résultats prometteurs (Averbeck et al., 1989). De même, en plus d'un meilleur contrôle tumoral local, une amélioration de l'état de santé général, des effets palliatifs

et du taux de survie ont été observés chez des patients qui ont reçu un traitement du cancer combinant l'hyperthermie à la radiothérapie à et/ou à la chimiothérapie.

En Allemagne et en Hollande, l'hyperthermie est un standard pour le traitement des cancers du col utérin et de certains sarcomes. De nombreux essais cliniques européens sont en cours et un programme européen d'excellence, Eurotherm regroupant plus de 175 experts dans les domaines de la médecine hautement spécialisée a été proposé. Le but de ce projet est d'assurer le suivi et la collecte des informations reliés au traitement du cancer par l'hyperthermie afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette possibilité thérapeutique et d'évaluer son efficacité.

L'hyperthermie est également utilisée pour activer la transcription du matériel génétique après sa transfection au niveau de la tumeur. Cette étape comporte deux étapes majeures : la transfection du matériel génétique et l'activation de la transcription par hyperthermie locale modérée en présence d'un promoteur thermosensible.

Il est désormais, prouvé que l'hyperthermie modérée (42 à 45 °C) permet de potentialiser les effets de la radiothérapie en augmentant le taux de mortalité chez les cellules tumoral. En effet, les progrès technologiques récents permettent de traiter des tumeurs profondes par des ondes électromagnétiques en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'effet complémentaire additif dû à l'hyperthermie revient à la sensibilité des cellules tumorales dans des conditions d'hypoxie et de faible pH, ou des cellules en phase S de leur cycle cellulaire et qui sont relativement radiorésistantes.

Dans le cas de l'hyperthermie couplée à la chimiothérapie, l'effet bénéfique de l'hyperthermie ne se limite pas à la réduction de la quantité de médicaments administrés, mais également, à la potentialisation de leurs effets sur des cellules tumorales. La mitomycine C, le melphalane, la cisplatine, la doxorubicine, les

nitrosurées et le méthotrexate ont tous, démontré un meilleur effet thérapeutique lorsque l'hyperthermie est utilisée. Généralement, cette potentialisation est liée à une meilleure perfusion intra-tumorale des médicaments et l'augmentation de leurs concentrations suite à l'amélioration de la perfusion sanguine par l'hyperthermie. En effet, des études *in-vivo* utilisant la chimiothérapie couplée à l'hyperthermie ont montré une toxicité accrue des médicaments sur des cancers de la peau (cyclophosphamide, bléomycine), le coeur (doxorubine), les reins (cisplatine), le tractus urinaire (carmustine) et la moelle (nitrosurées).

D'une façon générale, tous ces essais cliniques montrent que l'hyperthermie est certainement une approche prometteuse et mérite plus d'attention qu'il n'en a reçu jusqu'à maintenant.

CHAPITRE II : L'APOPTOSE

2.1 Introduction

Avant d'aborder le chapitre sur la mort cellulaire par apoptose, il a été jugé utile de faire un rappel sur la mort cellulaire et ses étapes.

La mort cellulaire est un phénomène essentiel au bon déroulement de plusieurs processus biologiques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. De ce fait, la mort cellulaire joue un rôle fondamental dans le développement et l'établissement de systèmes nerveux et immunitaires efficaces. Cependant, plusieurs conditions anormales et stressantes peuvent induire la mort cellulaire, qui sera alors considérée par l'organisme comme accidentelle et non désirée.

La mort cellulaire peut se dérouler selon plusieurs processus que les scientifiques classent en deux catégories : la mort cellulaire passive non programmée et la mort cellulaire programmée active.

2.1.1 La mort cellulaire non programmée passive qui comprend l'oncose et la nécrose :

Ce type de mort cellulaire est le plus souvent brutal et les étapes qui y conduisent sont irréversibles. L'oncose ou Mort Cellulaire Passive (MCP) prend son étymologie du grec *onkos* et signifie « masse, volume ». L'oncose doit son nom au fait que, dans ce type de perturbation prélétales, la cellule commence par devenir plus volumineuse presque immédiatement après une lésion (Majno and Joris 1995), en raison d'une augmentation de la concentration en cations dans le cytosol cellulaire. Le principal cation responsable de ce changement de volume est le sodium. Cependant, en absence d'ATP ou si la Na^+/K^+ -ATPase du plasmalemm est inhibée, les protéines intracellulaires cessent d'assurer le contrôle du volume et le sodium cytosolique augmente (Bortner and Cidlowski 2007). Parmi les phénomènes précoces de l'oncose

on observe une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ qui conduit au changement de volume cellulaire. De même l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , résultant soit d'un influx à partir de l'espace extracellulaire, soit de sa libération à partir des lieux de stockage intracellulaires; résulte en un gonflement du cytosol, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ainsi que la formation de vésicules aqueuses autour de la surface cellulaire (Bernardi and Rasola 2007). Les mitochondries subissent dans un premier temps une condensation, suivie ultérieurement d'un gonflement très important lié aux lésions de la membrane mitochondriale interne. Dans ce type de lésion pré-létale, la chromatine finit par se dégrader après avoir subi une condensation ; néanmoins, le profil en échelle caractéristique de l'apoptose n'apparaît pas (Walker, Harmon et al. 1988).

La nécrose, quant à elle, est une mort cellulaire dite «accidentelle», qui survient lors d'un dommage tissulaire (hypoxie, infection, traumatismes, etc.). Cette mort touche un ensemble de cellules d'un tissu, contrairement à l'apoptose qui, la plupart du temps, n'affecte que des cellules individuelles au sein d'un tissu. Au cours de la nécrose, l'ADN nucléaire est dégradé de manière «aléatoire» (Bicknell and Cohen 1995; Dong, Saikumar et al. 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong, Saikumar et al. 1997). La nécrose s'accompagne d'un œdème cellulaire aboutissant à la lyse de la membrane plasmique. Cet éclatement cellulaire entraîne le relargage du contenu cytosolique et notamment d'enzymes dans le milieu environnant, qui sont responsables de la lyse des membranes des cellules voisines. Ce phénomène concourt à une réaction inflammatoire (Kerr 1971) néfaste pour l'organisme (Figure 2.1).

2.1.2 La mort cellulaire programmée active

Ce groupe est lui aussi à subdiviser en deux sous-groupes dépendamment de l'implication d'une famille de sérine protéases dites caspases. Ainsi trois types de mort cellulaire font partie intégrante de la mort cellulaire programmée active;

l'autophagie et la paraptose qui se déroulent indépendamment des caspases et l'apoptose qui se déroule à l'issue de l'induction des caspases.

2.1.2.1 La mort cellulaire indépendante des caspases et impliquant l'autophagie de type II et la paraptose de type III

La paraptose se distingue de l'apoptose par l'apparition des vacuoles dans le cytoplasme, ce qui explique qu'on l'aurait longtemps confondue avec la nécrose. Les gènes et les mécanismes impliqués dans la survenue et le contrôle de la paraptose sont encore méconnus. La seule chose dont soit sûre l'équipe de Bredesen est que la paraptose ne dépend pas des molécules de la famille des caspases (Sperandio, Poksay et al. 2004; Bredesen 2007). Cependant, cette observation se heurte aux conditions expérimentales puisque seuls les facteurs trophiques ont été utilisés comme facteur de stress.

La mort par autophagie, par contre, est en cours de caractérisation. Le terme « autophagie » prend son étymologie du grec *onkos* et signifie « se manger soi-même ». Chez les animaux, les végétaux et la levure, l'autophagie a principalement été décrite lors d'une carence en nutriments pour les récupérer à des fins de survie. À ce jour, l'autophagie est connue pour permettre le maintien du métabolisme, de la production d'ATP ainsi que pour prévenir le déclenchement de l'apoptose (Cuervo, Bergamini et al. 2005; Kurz, Terman et al. 2007).

Contrairement à l'autophagie de survie, l'autophagie associée à la mort cellulaire se caractérise par une augmentation de l'expression de certains gènes atg dont atg6 ou beclin1. La protéine bécline 1 s'est avérée indispensable à la formation de la vacuole autophagique ou autophagosome lors du processus d'autophagie. L'interaction de la protéine bécline1 avec la protéine Bcl2 est primordiale dans l'équilibre autophagie de survie ou mort autophagique.

Sur le plan cellulaire, l'autophagie peut se résumer en trois étapes : tout d'abord, la formation d'une vacuole initiale (lysosome ou autophagosome) permettra de

séquestrer le matériel cytoplasmique. Ensuite, ces organites vont se transformer en vacuole dégradative et vont fusionner avec le lysosome. Ceci permettra alors l'apport d'un grand nombre d'enzymes servant à dégrader la plupart des macromolécules biologiques et les organelles séquestrés comme l'appareil de Golgi, les ribosomes, le réticulum endoplasmique et le noyau. Cependant, puisque les microfilaments sont préservés, on suppose que le cytosquelette est requis pour l'autophagocytose (Bursch and Ellinger 2005). Jusqu'à date, trois formes d'autophagie ont été décrites : l'autophagie influencée par les chaperones et stimulée par la carence en nutriments, la macroautophagie impliquant la formation de vésicules cytosoliques à double membrane et la microautophagie qui est encore méconnue à l'heure actuelle. La microautophagie survient lorsque le cytoplasme est séquestré par invagination de la membrane lysosomale/vacuolaire (Massey, Zhang et al. 2006; Klionsky, Cuervo et al. 2007; Kvam and Goldfarb 2007).

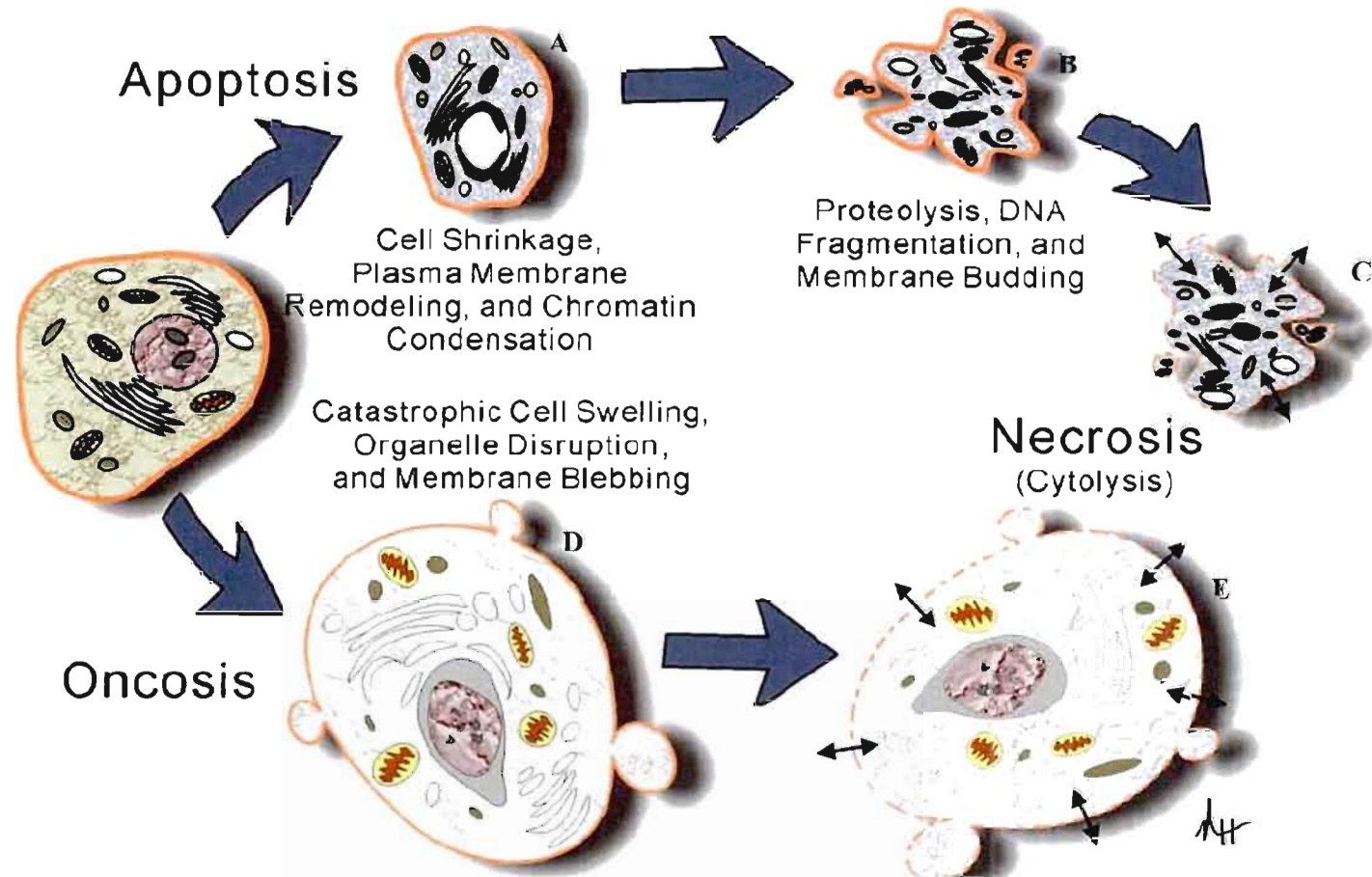


Figure 2.1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose. En dépit de la diversité des signaux de mort, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires : (A) condensation de l'ADN et dislocation des organites; (B) bourgeonnement de la membrane plasmique et formation des corps apoptotiques. Contrairement à l'apoptose, la nécrose, considérée comme une mort cellulaire passive caractérisée par une modification de la perméabilité membranaire entraînant une entrée massive d'eau, une dilatation du cytoplasme et des organites (D), la rupture des membranes et la libération dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique (E), déclenchant ainsi une réaction inflammatoire. Figure adaptée de Hail and Carter 2006.

2.1.2.2 La mort cellulaire dépendante des caspases et impliquant l'apoptose de type I

La mort cellulaire physiologique de type I, ou apoptose, est une forme de suicide cellulaire qui apparaît au cours du développement afin de contrôler le nombre de cellules et maintenir l'homéostasie tissulaire. L'initiation et l'exécution de l'apoptose impliquent des interactions entre des signaux extérieurs dans l'environnement cellulaire et des récepteurs internes sensibles aux dommages cellulaires. L'apoptose peut être initiée par de nombreux stress cellulaires, incluant les agents cytotoxiques ou encore les rayons γ . Ainsi, plusieurs médicaments utilisés en cancérologie agissent en promouvant la mort par apoptose des cellules cancéreuses. Dans ce manuscrit, on s'intéressera uniquement à la mort cellulaire par apoptose et aux mécanismes de son induction par l'hyperthermie comme alternative au traitement du cancer.

Toutefois, la classification actuelle des différents types de mort cellulaire mène à quelques ambiguïtés sur les termes et les critères choisis et présente donc des limites puisque des critères apoptotiques et autophagiques peuvent être observés dans une même cellule. Par exemple, la perméabilisation de la membrane mitochondriale pourrait être observée chez des cellules mourantes par autophagie, par nécrose ou par apoptose, mais à des degrés différents. En effet, dans le cas où peu de mitochondries sont altérées, l'activation de l'autophagie conduit à la destruction lysosomale des mitochondries affectées et à la réparation de la cellule. Lorsque plusieurs mitochondries sont impliquées, la perméabilisation mitochondriale commence à promouvoir l'apoptose, suite au relargage de cytochrome c et plusieurs autres facteurs pro-apoptotiques. Finalement, lorsque toutes les mitochondries de la cellule sont altérées, la quantité d'ATP devient profondément réduite et la mort cellulaire nécrotique s'ensuit rapidement. Cette manière graduelle de fonctionner permet à la cellule d'abord de promouvoir la réparation, ensuite la réabsorption cellulaire et finalement la détérioration massive et non sélective des tissus (Rodriguez-Enriquez,

He et al. 2004).

2.2 Généralités sur l'apoptose

Le terme apoptose dérive d'une nomenclature latine désignant la chute automnale des pétales ou des feuilles et a été utilisé pour la première fois par Kerr et ses collaborateurs en 1972 pour décrire une forme de mort cellulaire différente de la nécrose (Kerr, Wyllie et al. 1972). Il s'agit d'une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé, qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Elle est également indispensable au remodelage, au maintien de l'homéostasie tissulaire (Evan and Littlewood 1998) et à la régulation des réponses immunitaires (ex : l'auto-sélection positive des lymphocytes). Elle permet, en effet, de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles (Rai, Tripathi et al. 2005).

Une apoptose insuffisante peut être à l'origine de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé. Les cellules cibles de l'immunité à médiation cellulaire meurent également par apoptose. Il s'agit des cibles reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules tueuses Natural Killer (NK). D'un autre côté une apoptose inefficace, dérégulée ou bien suractivée est observée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies néoplasiques, neuro-dégénératives ou ischémiques. La place de l'apoptose en pathologie infectieuse est également grandissante, prenant une importance capitale dans la compréhension du développement des maladies bactériennes ou virales, en particulier celles liées au virus de l'immunodéficience humaine (Kaul, Garden et al. 2001; Hacker, Kirschnek et al. 2006).

2.3 Changements morphologiques au cours de l'apoptose

Contrairement à la nécrose, la mort des cellules par apoptose se caractérise par de profonds changements morphologiques, génétiques et biochimiques stéréotypés. Une des premières modifications morphologiques due à l'apoptose est la réduction du volume cellulaire (Figure 2.1). Au cours de cette étape, le cytoplasme se condense et les organites cellulaires sont morphologiquement intacts (Abraham and Shaham 2004; Zlender 2006). Le noyau, quant à lui, se rétrécit, la chromatine se condense, se fragmente, forme des amas puis des croissants accolés à l'enveloppe nucléaire. Ce phénomène est habituellement accompagné d'une fragmentation irréversible de l'ADN nucléaire. La fragmentation de l'ADN par des endonucléases prend la forme d'un clivage de l'ADN en larges fragments de 300 000 et/ou de 50 000 paires de bases. Cette première fragmentation est typiquement suivie d'un clivage internucléosomal très spécifique du processus apoptotique, qui aboutit à l'apparition de monomères ou d'oligomères de 180-200 paires de bases (Rovere-Querini, Brunelli et al. 2008).

La membrane plasmique est le siège de remaniements regroupés sous le nom de zéose. Elle présente des irrégularités, puis des boursofflures sous forme de doigts de gants qui donnent naissance à des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme et des organites cellulaires à l'état intact. Ces changements morphologiques sont souvent accompagnés de changements biochimiques comme la translocation de résidus phosphatidylsérines sur la face externe de la bicouche lipidique (Loro, Vintermyr et al. 2005). L'ensemble de ces modifications entraîne la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages et prévient le déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, empêchant ainsi toute réaction inflammatoire locale (Fadok, Voelker et al. 1992; Martin and Green 1995; Martin, Takayama et al. 1995).

2.4 Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

Il existe aujourd'hui plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'apoptose (Figure 2.2). D'une manière plus explicite, les chercheurs ont classé ces voies signalétiques en trois principales voies. La première, est appelée voie intrinsèque. Elle met en jeu la mitochondrie et occupe une place centrale dans les mécanismes moléculaires de l'apoptose. La deuxième voie, connue aussi sous le nom de voie des récepteurs de mort, est une voie extrinsèque initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires. Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clef dans l'apoptose et, par conséquent, elles sont qualifiées de voies signalétiques dépendantes des caspases (Figure 2.2). Récemment, plusieurs autres voies ont été découvertes et sont en cours d'investigation, comme la voie indépendante des caspases mettant en jeu une protéine mitochondriale inductrice de l'apoptose (AIF), la voie du granzyme B lors des réponses inflammatoires, ou encore l'apoptose médiée par l'endonucléase G. Outre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress rigoureux (Srivastava and NetLibrary; Manskikh 2007; Ziegler and Kung 2008).

Suite à son déclenchement, le processus apoptotique se déroule en trois phases :

1. Une phase d'induction variant en fonction des signaux déclencheurs ;
2. Une phase effectrice nécessitant l'activation des caspases ;
3. Une phase de dégradation caractérisée par des changements morphologiques typiques.

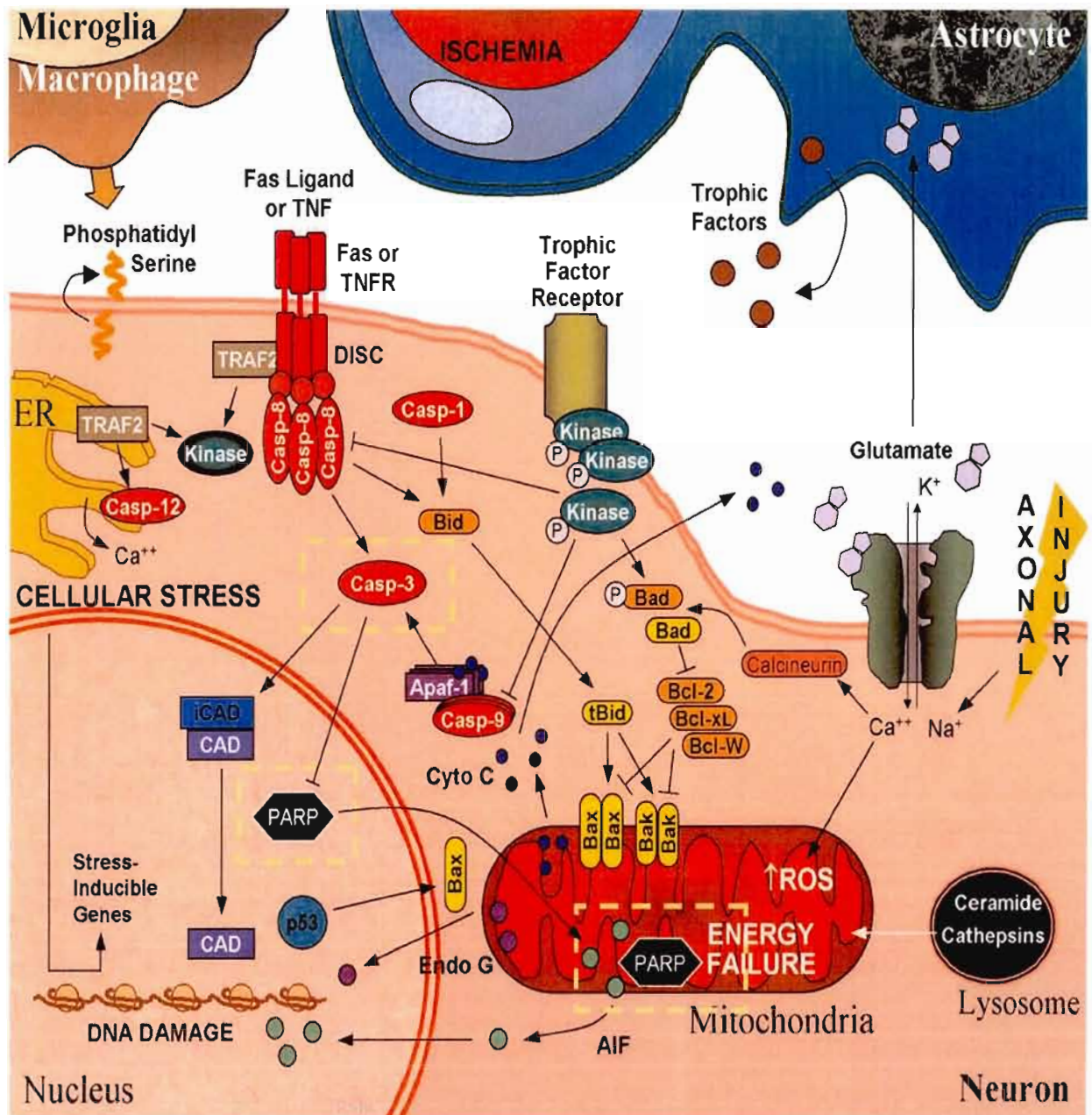


Figure 2.2 : Représentation schématique des différentes voies moléculaires de l'apoptose. La signalisation cellulaire conduisant à l'apoptose fait intervenir des mécanismes complexes. La mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les récepteurs de mort sont les trois principales voies de signalisation conduisant à l'apoptose suite à l'activation des caspases initiatrices: la caspase 8 et la caspase 10 pour la voie extrinsèque et la caspase 9 activée via l'apoptosome pour la voie intrinsèque. Les caspases initiatrices activent alors des caspases dites d'exécution (caspase 3), qui vont cliver divers substrats (ICAD, PARP...). Dans le cas du RE, l'activation de la caspase 12 pourrait survenir suite à l'activation de la caspase 7. Il peut y avoir interaction entre ces trois voies, par le clivage de BID (membre de la famille Bcl2), qui va activer la voie mitochondriale et amplifier le signal apoptotique. Figure adaptée de Zhang et al., 2005.

2.4.1 Voie des récepteurs de mort cellulaire

Dans cette voie extrinsèque de l'apoptose, l'activation des différents récepteurs de mort se trouvant ancré à la membrane cytoplasmique aboutit à l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire complexe. Les récepteurs de mort sont classés en sept familles ; Fas (CD95/APO-1), les récepteurs de mort DR3, DR6, p75NGFR (facteurs de croissance nerveux), ainsi que les deux récepteurs de TRAIL, les molécules DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) et le facteur de nécrose tumorale TNF-R1 (p55/CD120a; Locksley *et al.*, 2001). Cette dernière, comprend au moins une vingtaine de membres classés en deux groupes selon leurs structures :

- 1 Le premier groupe comprend les récepteurs qui possèdent un domaine de mort (DD) intracellulaire comme le TNF-R1. Ils assurent la transmission d'un signal apoptotique par activation des caspases (Figure 2.3).

- 2 Un deuxième groupe comprend les récepteurs qui ne possèdent pas de DD, comme pour TNF-R2. Ces récepteurs recrutent d'autres molécules capables d'activer le facteur de transcription NF- κ B, connu pour son rôle dans le maintien de la survie cellulaire (Locksley, Killeen et al. 2001; Gupta 2005; Jin and El-Deiry 2005).

Certains de ces récepteurs nécessitent des molécules adaptatrices pour assurer leurs fonctions proapoptotiques. On cite, à titre d'exemple, les protéines associées au domaine de mort du récepteur Fas (FADD) ou du récepteur TNF-R1 (TRADD) qui vont se lier respectivement au Fas-R et au TNF-R1 pour assurer le recrutement des caspases. Ce mode d'activation varie d'un récepteur à un autre. Dans le cas des récepteurs TNF-R ou Fas-R, par exemple, après fixation du ligand, le récepteur se trimérise et entraîne une modification de conformation du domaine DD. Ce changement de conformation permet la fixation de la protéine, associée au TNF-R1, avec le domaine de mort (TRADD) sur le TNF-R1 et l'association de FADD avec Fas-R.

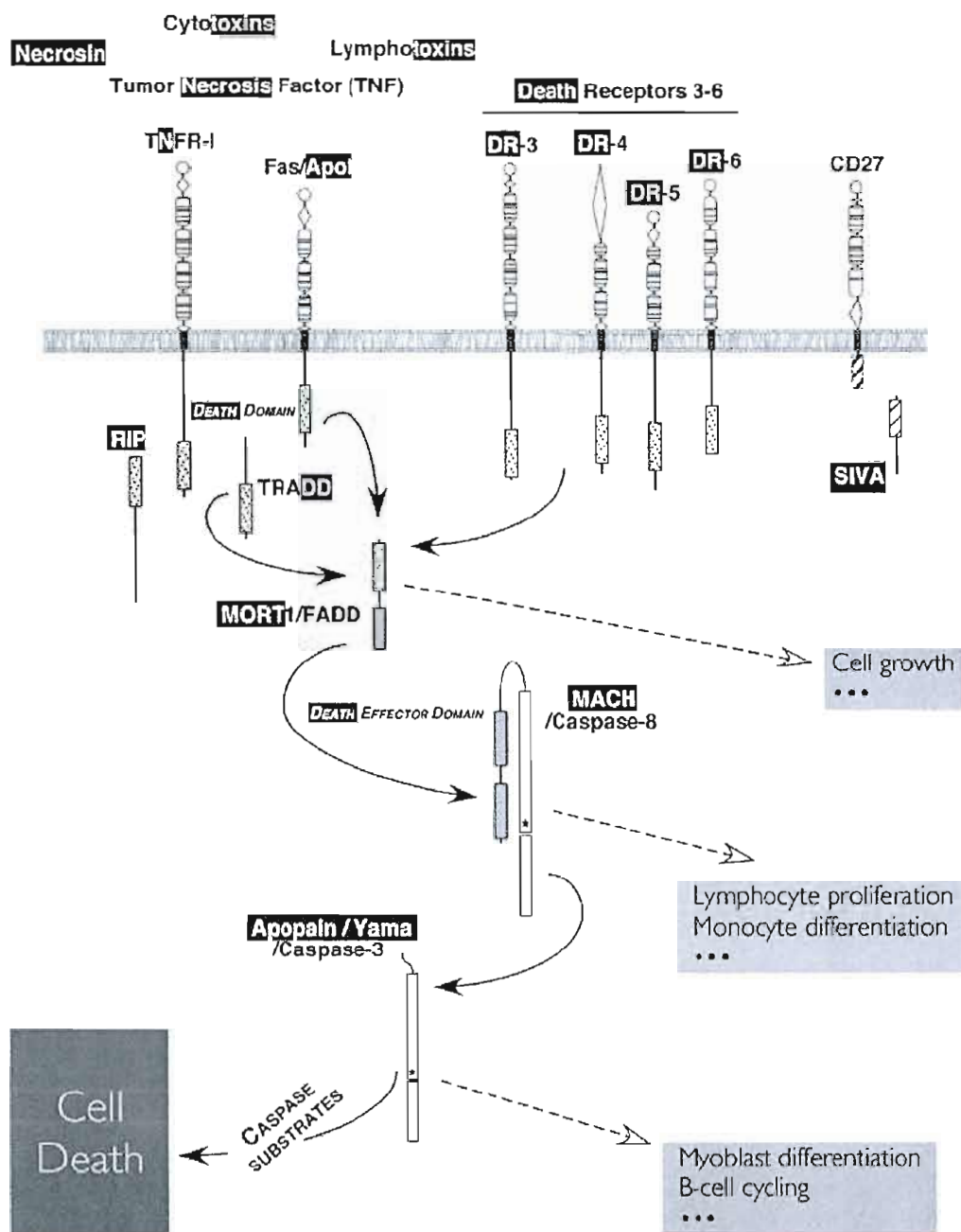


Figure 2.3 : La voie des récepteurs de mort Fas et TNF-R1. La signalisation de la voie du récepteur de mort active se fait par sa région cytoplasmique connue sous le nom de domaine de mort (DD). La fonction de cette séquence conservée est de recruter de protéines adaptatrices au niveau du DD. Ces protéines adaptatrices appelées domaine de mort associé au Fas (FADD) ou domaine de mort associé au TNF (TRADD) et possèdent leur propre DD par lequel elles sont recrutées au niveau des récepteurs actifs. Les protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé domaine effecteur de mort (DED) dont la fonction est de recruter la pro-caspase 8 ou 10 via leurs domaines DED. Le complexe ainsi formé est appelé complexe de signalisation de mort (DISC). Figure adaptée de Wallach et al., 2008

Une fois fixée au récepteur, TRADD ou FADD s'associe à la procaspase 8 pour former un complexe de signalisation de mort dit DISC, assurant l'auto-clivage de la procaspase 8 ou 10. La caspase 8/10 activée déclenche une cascade d'activation d'autres caspases, dont la caspase 3, qui clivent alors certaines protéines cellulaires essentielles à la survie (PARP, la protéine Tau, les protéines de cytosquelette...) (Hengartner 2000; Hengartner and Bryant 2000). Cette étape peut être régulée par une protéine appelée c-Flip (pour FLICE inhibitory protein; Irmeler et al., 1997). c-Flip contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10, et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort (notamment Fas-R et TNF-R ; (Bump, Hackett et al. 1995).

2.4.2 Voie intrinsèque : voie mitochondriale

Mis à part son rôle dans la production d'ATP, la mitochondrie joue un rôle important dans la régulation des mécanismes moléculaires de l'apoptose. En effet, de nombreux changements biochimiques surviennent au niveau des mitochondries suite aux stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, des radiations ionisantes, ou d'un sevrage en cytokines (Mohamad, Gutierrez et al. 2005). Parmi ces changements, on cite la perméabilisation de la membrane mitochondriale, accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Psi\Delta_m$) et de l'ouverture des mégapores mitochondriaux (Zornig, Hueber et al. 2001). Cette altération est considérée comme le point de non-retour du processus apoptotique. La perturbation du potentiel membranaire mitochondrial a pour principales conséquences l'altération de la production d'ATP et le relargage de plusieurs substances de l'espace inter-membranaire vers le cytosol (Kelly, Sandoval et al. 2003). Le facteur inducteur de l'apoptose « AIF », la protéine inhibitrice des protéines activatrices de l'apoptose, nommée selon leurs fondateurs Diablo (Verhagen, Ekert et al. 2000) ou Smac (Du,

Fang et al. 2000)(Smac/Diablo, pour Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low pI) et le cytochrome C sont parmi les principaux facteurs impliqués dans cette voie intrinsèque (Figure 2.4). Une fois libéré par la mitochondrie, le cytochrome C s'associe au facteur d'activation des protéases apoptotiques Apaf-1, qui s'unit à la procaspase 9 en présence d'ATP pour former l'apoptosome (Hengartner 2000). Dans ce complexe, la caspase 9 est activée et clive les protéases «effectrices» (caspases 3, 6 et 7) qui entraînent l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Zou, Henzel et al. 1997).

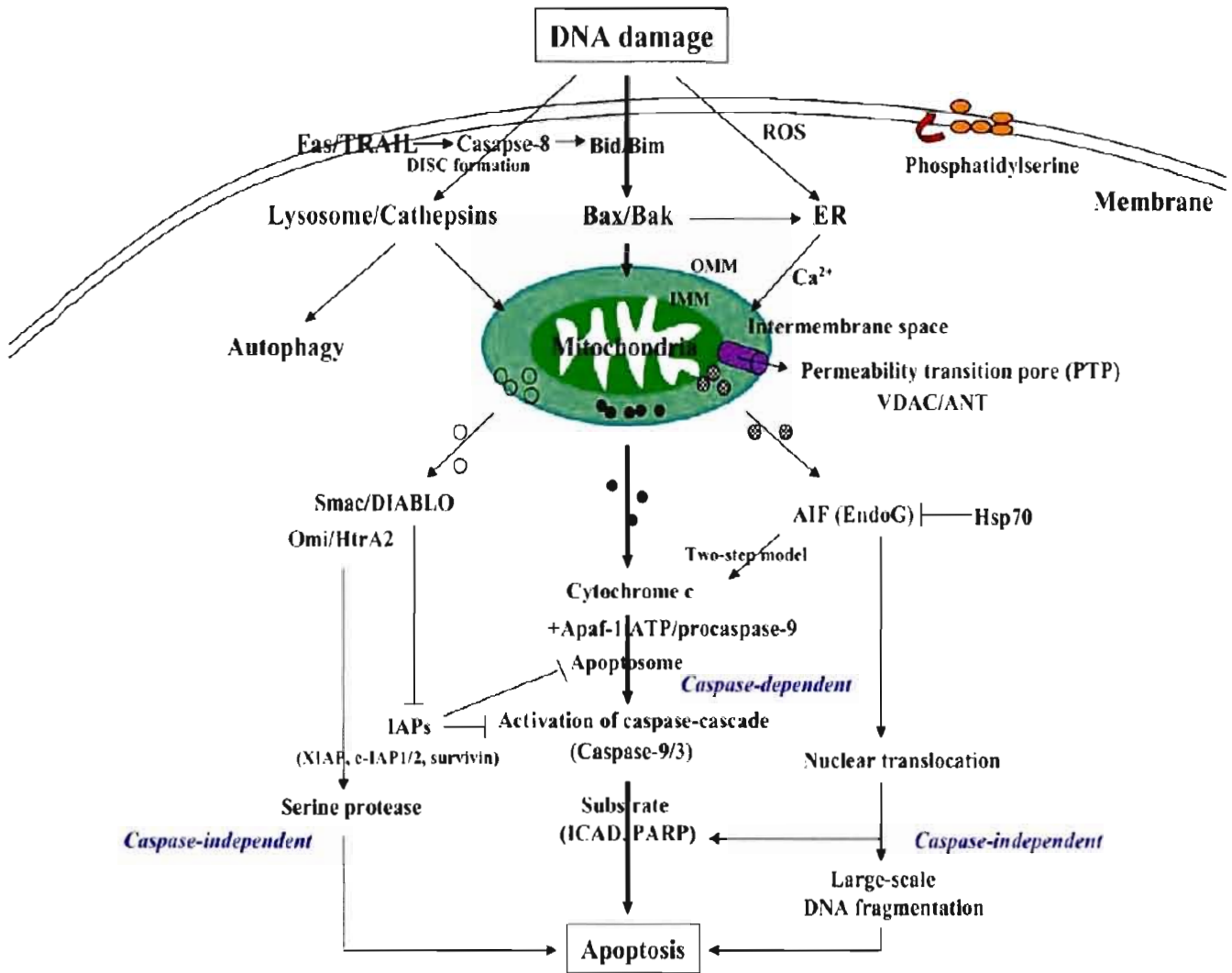


Figure 2.4 : Représentation schématique de la voie mitochondriale de l'apoptose. La voie intrinsèque, initiée par différents signaux peut conduire à l'apoptose via la mitochondrie. Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 telles Bax, Bik, Bak, Bid, Bad et Bim sont des médiateurs importants de ces signaux. La voie mitochondriale est initiée par la libération du cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques (AIF et Endo-G). Le cytochrome c se fixe au facteur d'activation des protéases apoptotiques 1 (Apaf-1), à l'ATP et à la pro-caspase 9 pour former un complexe nommé l'apoptosome. Lorsque l'apoptosome est formé, la caspase 9 initiateur d'apoptose est activée. Ce type d'apoptose via la mitochondrie peut être inhibé à différents niveaux par des protéines anti-apoptotiques, incluant les IAPs, Bcl-2 et Bcl-xL. Figure adaptée de kim et al, 2006.

2.4.2.3 Rôle de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 est un ensemble de protéines qui jouent un rôle important dans l'apoptose. Elles sont nombreuses et sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire grâce à leur séquence transmembranaire carboxyterminale (Figure 2.5). Elles sont classées en deux groupes :

- 1 Les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contenant quatre domaines appelés BH (BH1 à BH4, pour domaine homologue au Bcl-2) correspondant à des hélices α et essentiels aux fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2. Le domaine BH4, spécifique des molécules anti-apoptotiques, n'est pas retrouvé dans le deuxième groupe ;
- 2 Les molécules proapoptotiques (comme Bax et Bok) présentant des homologies souvent remarquables entre leurs domaines BH 1 à 3. Leur translocation du cytosol vers la mitochondrie conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome C, aboutissant ainsi à l'induction de l'apoptose via l'activation de la procaspase 9 (Youle and Strasser 2008).

Le domaine transmembranaire est présent au niveau de tous les membres de la famille Bcl-2, à l'exception de Bad et Bid, et il permet l'ancrage des protéines aux membranes mitochondriales, du réticulum endoplasmique et du noyau (Krajewski, Tanaka et al. 1993).

Le rapport entre le niveau des protéines pro et anti-apoptotiques semble déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose (Nguyen, Branton et al. 1994; Sedlak, Oltvai et al. 1995). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL exercent leur effet anti-apoptotique en partie par leur liaison à la protéine proapoptotique Bax au niveau de leurs domaines BH1, BH2 et BH3. Une telle interaction prévient la libération du

cytochrome C, essentiel pour la formation de l'apoptosome et pour l'activation des caspases. D'autre part, l'emplacement sur la membrane externe du RE ou de la mitochondrie de certains membres de la famille Bcl-2, entre autre Bax et Bim, Puma et Noxa, leur permet de jouer un rôle de canaux ioniques régulant le flux calcique (Daniel and Smythe 2004). Pour certains membres de la famille Bcl-2, notamment Bad et Bim, la phosphorylation est un facteur déterminant dans la régulation de leur activité proapoptotique (Figure 2.6). En présence du facteur de croissance interleukine 3 (IL-3), la protéine proapoptotique Bad est phosphorylée au niveau de deux sérines (ser 112 et ser 136) par la kinase Akt de façon dépendant de la PI3Kinase. La phosphorylation de Bad régule son emplacement dans la cellule et son rôle proapoptotique. Une fois phosphorylée, Bad ne peut plus lier Bcl-2 ou Bcl-xL et sera donc séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 (Zha, Harada et al. 1996) avant d'être dégradée par le protéasome. En l'absence d'IL-3, Bad déphosphorylée entraîne la libération de la protéine 14-3-3 et donc le démasquage du domaine BH3 (Figure 2.6). Ce dernier peut alors interagir avec Bcl-xL ou Bcl-2 bloquant ainsi leur activité anti-apoptotique (Kelekar, Chang et al. 1997; Zha, Harada et al. 1997).

La phosphorylation de Bim, par contre, est nécessaire pour son activité proapoptotique. Dans des conditions physiologiques normales, la protéine Bim est séquestrée par la chaîne légère 1 de la dynéine (DLC1) sur le réseau des microtubules de la cellule. La phosphorylation de Bim sur les sites de liaison à DLC1 a pour effet d'induire sa libération dans le cytosol et sa migration vers la mitochondrie (Lei and Davis 2003).

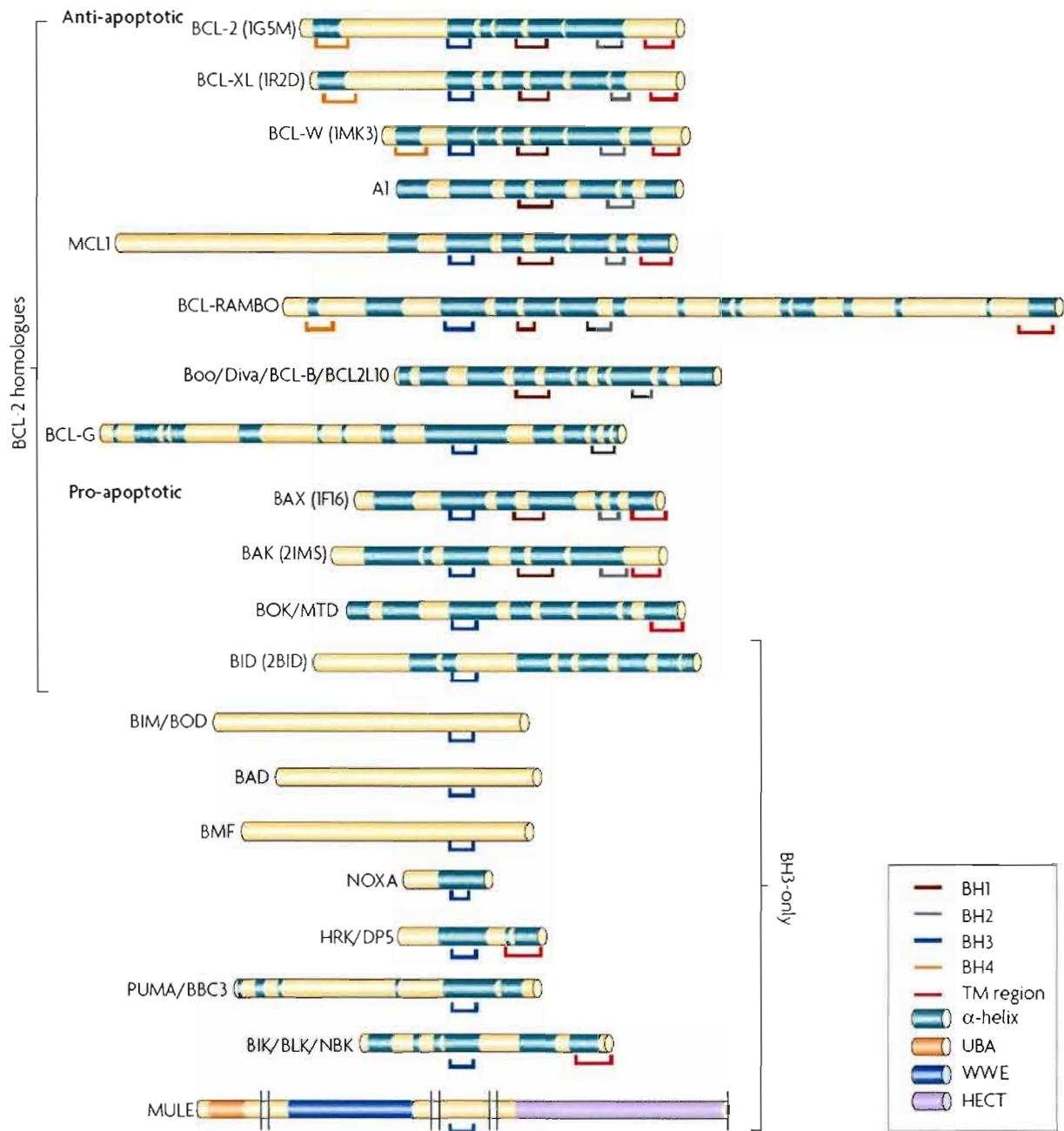


Figure 2.5: Classification des membres de la famille de Bcl-2. Seulement certains membres représentatifs sont montrés et sont retrouvés chez les mammifères, sauf mention contraire. Les domaines Bcl-2 Homology, le module d'interaction Trp-Trp-Glu, le domaine HECT ubiquitin ligase et les segments transmembranaires TM sont indiqués à droite. Figure adaptée de Youle and Strasser 2008.

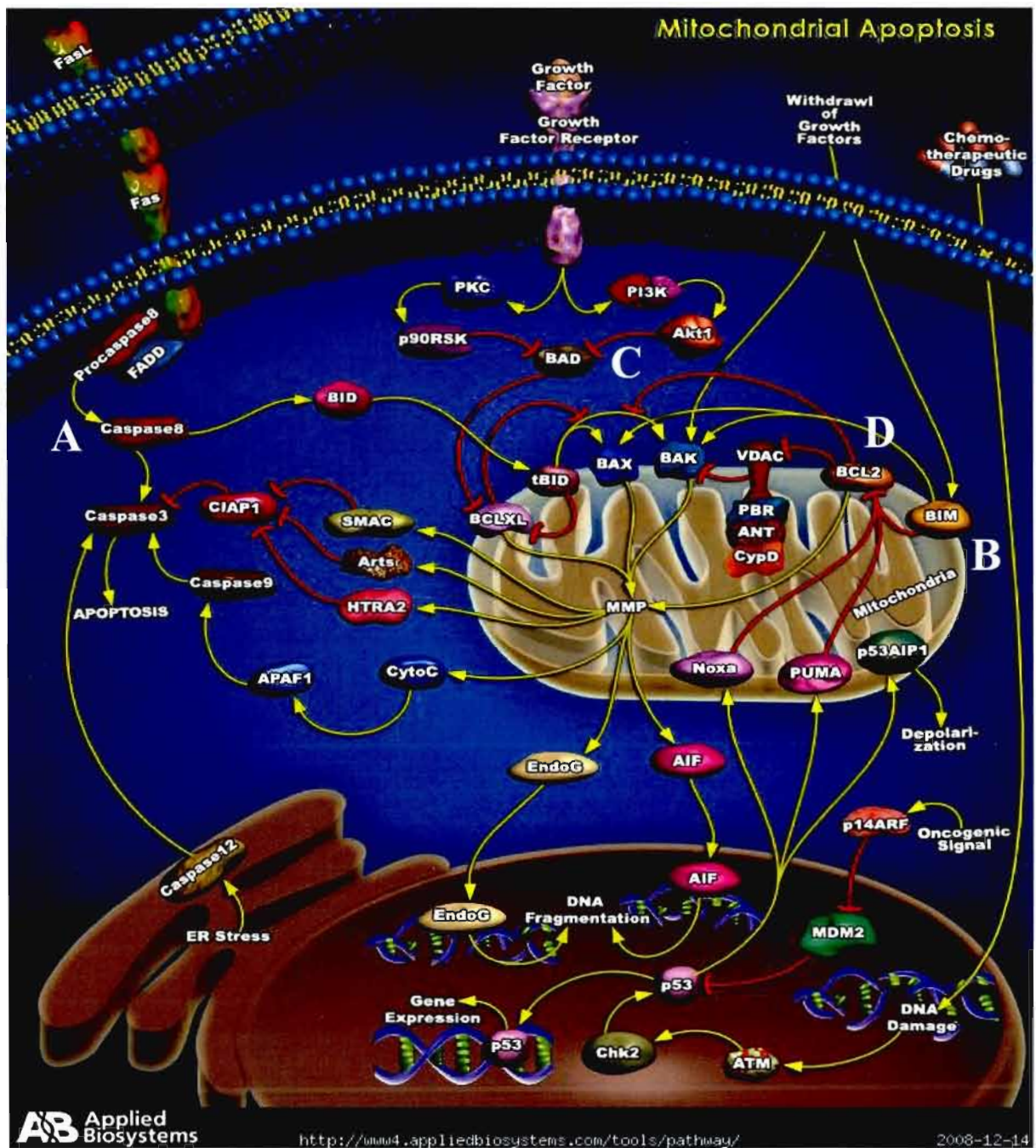


Figure 2.6 : Représentation schématique des mécanismes d'interaction entre les divers membres de la famille Bcl-2. Tous les membres Bcl-2 à l'exception de Bid et Bad possèdent un domaine peptidique C terminal hydrophobe de 20 acides aminés qui permet aux protéines de s'ancrer dans une membrane. La caractéristique importante des protéines de la famille de Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétéro-dimères. La balance entre la vie ou la mort est influencée par le ratio de dimères anti- vs pro-apoptotiques. Ainsi, la formation majoritaire de dimères anti-apoptotiques préserve la vie cellulaire, alors que la présence accrue de dimères pro-apoptotiques conduit vers la mort cellulaire. Ce ratio est lui aussi influencé par le taux d'expression, la localisation de ces protéines, de leur niveau de phosphorylation ou encore de clivages protéolytiques. (A) La caspase 8 active clive la protéine Bid en tBid. Ce fragment induit un changement conformationnel et la translocation de Bax à la mitochondrie. Ceci cause le relargage du cytochrome c. (B) Suite à un dommage au niveau des microtubules, la protéine Bim est libérée et empêche par inhibition compétitive l'action anti-apoptotique de Bcl-2. (C) La protéine Bad, quant à elle est activée par déphosphorylation conduisant à sa dissociation de la protéine 14-3-3. (D) Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL sont anti-apoptotiques lorsqu'elles ne sont pas inhibées. Elles assurent la stabilisation de la membrane mitochondriale externe et empêchent l'action des membres Bcl-2 pro-apoptotiques. Figure adaptée de <http://www.ambion.com/tools/pathway/>

2.4.2.2 Le pore de perméabilité transitoire (PPT)

L'ouverture de ce pore serait associée à la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$; (Zamzami, Maise et al. 2001)) résultant en une entrée massive d'eau et d'ions, provoquant un gonflement suivi d'une rupture de la membrane externe mitochondriale et de la libération des protéines apoptogènes. L'ouverture et la fermeture de ce pore seraient, entre-autres, régulées par les membres de la famille Bcl-2.

2.4.2.3 La formation de canaux ioniques non spécifiques

Plusieurs hypothèses retenues à l'heure actuelle suggèrent que ces protéines subissent des réarrangements structuraux au niveau de la membrane mitochondriale pour former des hétéro- ou des homodimères capables de former des pores membranaires, soit seuls, après oligomérisation, soit en association avec d'autres protéines telles que la porine mitochondriale (connue également sous le nom de canal anionique voltage-dépendant VDAC) ou l'adénine nucléotide translocase (ANT) (Figure 2.7). En effet, au cours de l'apoptose, suite au clivage de Bid, sa forme tronquée (tBid) est connue pour interagir avec Bax et le libère de son interaction avec Bcl-2 ou Bcl-xL. Ceci induit un changement de conformation de Bax, sa translocation et son oligomérisation dans la membrane externe de la mitochondrie (Figure 2.7). tBid peut également transloquer à la mitochondrie et activer Bak, induisant son oligomérisation dans la membrane mitochondriale. Bax et Bak forment alors des canaux hétérotétramériques à travers lesquels le cytochrome c peut être relargué dans le cytosol. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bcl-2 et Bcl-xL, inhibent le changement de conformation et l'oligomérisation de Bax et de Bak. Les membres pro-apoptotiques à unique domaine BH3 tels que Bad, Bim, Bmf et Noxa interagissent avec Bcl-2 et Bcl-xL, inhibant leur fonction protectrice et pouvant même les convertir en membres pro-apoptotiques (Youle and Strasser 2008).

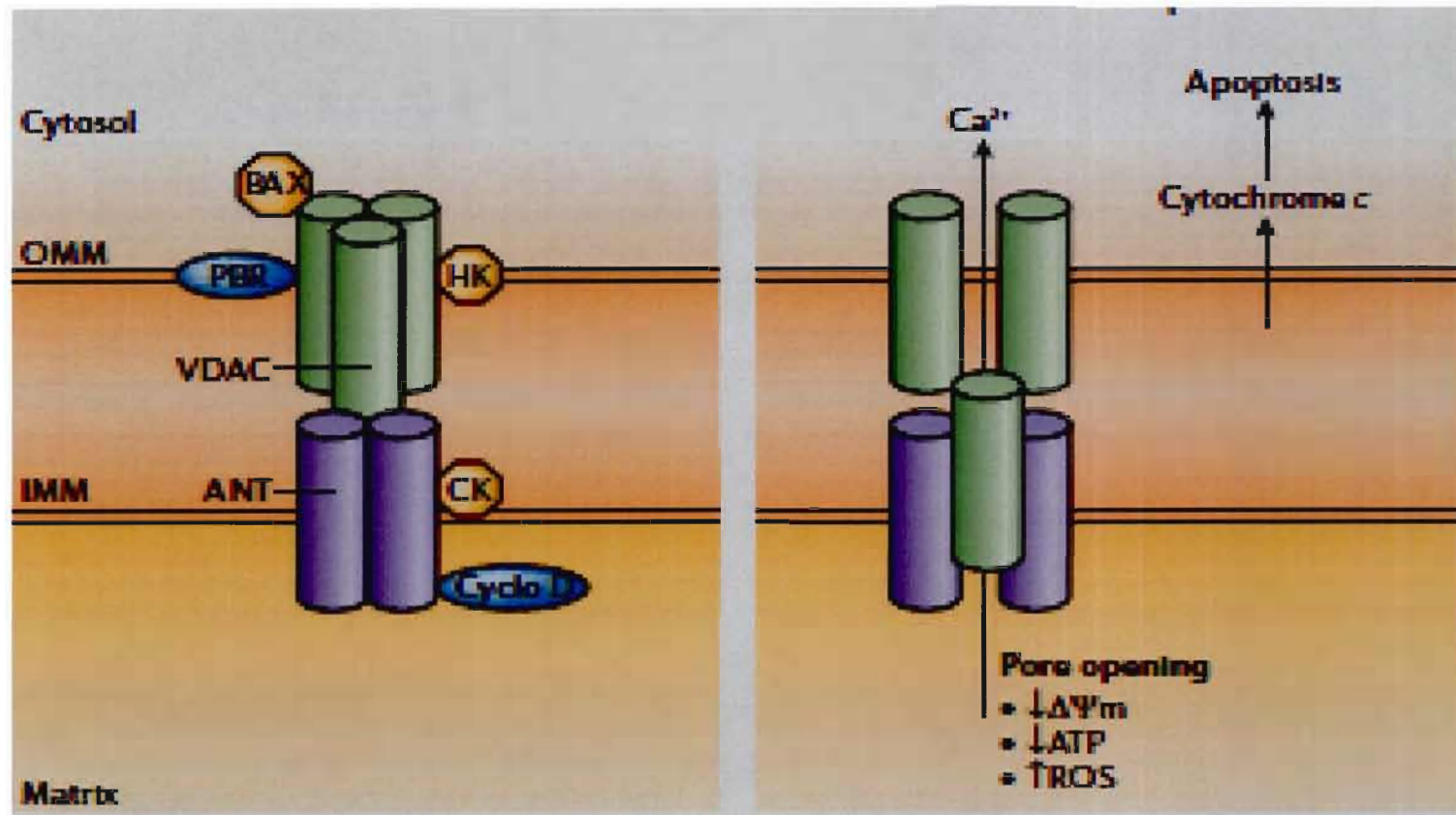


Figure 2.7: Représentation schématique de l'ouverture des pores de transition de perméabilité PTP. La perméabilisation de la membrane mitochondriale pourrait résulter de l'ouverture du PTP, un complexe multi-protéique situé aux points de contact entre la membrane externe et interne de la mitochondrie. Il s'agit d'un complexe formé de la porine mitochondriale (VDAC, canal anionique voltage dépendant) localisée à la membrane externe, du translocateur de l'adénine (ANT) localisée à la membrane interne et de la cyclophiline D se trouvant dans la matrice. VDAC et ANT peuvent former des pores non-spécifiques et s'ouvriraient suite à l'action d'effecteurs pro-apoptotiques (tels que le Ca^{2+} , les radicaux libres (ROS) ou Bax). Cette ouverture provoquerait la dissipation du $\Delta \Psi_m$ et une perméabilité de la membrane interne aux molécules inférieures à 1500 daltons. Figure adaptée de Abou-Sleiman et al., 2006.

2.4.2.4. Rôle des caspases dans la transduction du signal apoptotique

Les caspases (pour Cysteiny Aspartate-Specific Protease) sont des médiateurs importants de la mort cellulaire. Elles sont caractérisées par la présence d'une cystéine dans leur site catalytique leur permettant de reconnaître puis cliver des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie carboxy-terminale par leur séquence consensus Aspartate-Glutamine-Valine-Aspartate soit DEVD, d'où le nom de caspase qui est dérivé de Cyst-Asp-protéase. Elles jouent un rôle primordial dans le processus apoptotique. En effet, l'activation de ces protéases conduit au clivage de protéines vitales pour la cellule (protéines cytoplasmiques et nucléaires impliquées dans le métabolisme, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose). Chez les mammifères, les caspases constituent une famille de 15 protéases à cystéine (Tableau 2.1). Normalement, elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, les zymogènes. L'activation de la caspase entraîne un clivage protéolytique du site DEVD de la proenzyme et l'association de la petite avec la grande sous unité catalytique au sein d'un complexe tétramérique, constituant ainsi la caspase active $(p10/p20)_2$ (Figure 2.8). Cette activation peut être réalisée soit par autocatalyse ou par une autre caspase. La cascade d'activation des caspases se fait à deux niveaux : les caspases d'amont, dites initiatrices, comme la caspase 8, la caspase 10 et la caspase 9 et dont l'activation, suite à divers stimuli, permet le clivage et l'activation subséquente d'autres caspases en aval, dites effectrices, comme la caspase 3, la caspase 6 ou la caspase 7 (Thornberry 1998; Thornberry and Lazebnik 1998) (Figure 2.9). Les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine qui interagit avec le domaine DED (caspases 8 et 10) ou CARD (domaine de recrutement des caspases) alors que les caspases effectrices possèdent un prodomaine court (Launay, Hermine et al. 2005; Youle and Karbowski 2005).

Tableau 2.1: Liste des différents membres de la famille des caspases. Les caspases sont des protéases à cystéine. Elles sont caractérisées par une spécificité absolue pour un aspartate en position P1 de leur site de clivage qui est très conservé (Howard et al., 1991). Il est composé d'un résidu à cystéine incluse dans une séquence peptidique de type QACRG. Il semble que plusieurs caspases partagent le même substrat dont le premier qui a été identifié est l'enzyme requise dans la réparation des molécules d'ADN poly-ADP-ribose polymérase (PARP) Tableau adapté de Alnemri et al., 1997 ; Nunez et al., 1998 ; Thornberry and Lazebnik, 1998.

<i>Caspase</i>	<i>Autre nom</i>	<i>Substrat</i>	<i>Motifs de clivage</i>	<i>Sites de clivage</i>	<i>Site actif</i>
<i>Caspase-1</i>	ICE	Pro-IL-1 β U1-70 kDa? PARP? Pro- Caspases-1, - 3, -4	YVHD - X DGPD - X DEVD- X	Asp-103, Asp119, Asp- 297, Asp-316	QACRG
<i>Caspase-2</i>	Nedd2, ICH-1	PARP	DEVD - X	Asp-152 (site exacte inconnu), Asp-316, Asp- 330	QACRG
<i>Caspase-3</i>	CPP32, Yama, apopain	PARP U1-70 kDa DNA-PK Protein Kinase C SREBP-1 et SREBP-2 ICAD	DEVD - X DGPD - X DEVD - X DMQD - X DXXD DEPD - X DEAD - X DETD- X/DAVD- X	Asp-9/Asp-28, Asp-175	QACRG

<i>Caspase</i>	<i>Autre nom</i>	<i>Substrat</i>	<i>Motifs de clivage</i>	<i>Sites de clivage</i>	<i>Site actif</i>
Caspase-4	ICE _{relII} , TX, ICH-2	Pro-IL-1 β U1-70 kDa? PARP ? Pro-Casp-1, - 3 et -4	LEVD-X (W/L)EHD -X	Asp-104, Asp-270, Asp- 289	QACRG
Caspase-5	ICE _{relIII} , TY		(W/L)EHD -X	Asp-121 (site exacte inconnu), Asp-311, Asp- 330	QACRG
Caspase-6	Mch2	Lamine A PARP ? U1-70 kDa	VEID - X DEVD - X DGPD - X	Asp-23, Asp-179, Asp- 193	QACRG
Caspase-7	Mch3, ICE- LAP3, CMH-1	PARP	DEVD - X	Asp-23, Asp-198	QACRG
Caspase-8	MACH, FLICE, Mch5	Touts les autres pro- caspases	IETD-X LETD-X	Asp-210, Asp-216, Asp- 374, Asp-384	QACQG
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	PARP ? Pro-Caspase- 3	DEVD - X	Asp-130 (site exacte non connu), Asp-315 (possibilité de clivage par granzyme B)/ Asp-330 (clivage par caspase-3)	QACGG

<i>Caspase</i>	<i>Autre nom</i>	<i>Substrat</i>	<i>Motifs de clivage</i>	<i>Sites de clivage</i>	<i>Site actif</i>
<i>Caspase-10</i>	Mch4	Tous les autres pro-caspases	IEAD-X	Asp-219, Asp-372	QACQG
<i>Caspase-11</i>	Ich-3		-----	-----	-----
<i>Caspase-12</i>	Caspase-12	ATAD/ADT D	-----	-----	-----
<i>Caspase-13</i>	Erice	WVSD	-----	-----	-----
<i>Caspase-14</i>	Viz	LGGD	DEVD-X	-----	-----
<i>Caspase-15</i>	-----	-----	-----	-----	-----

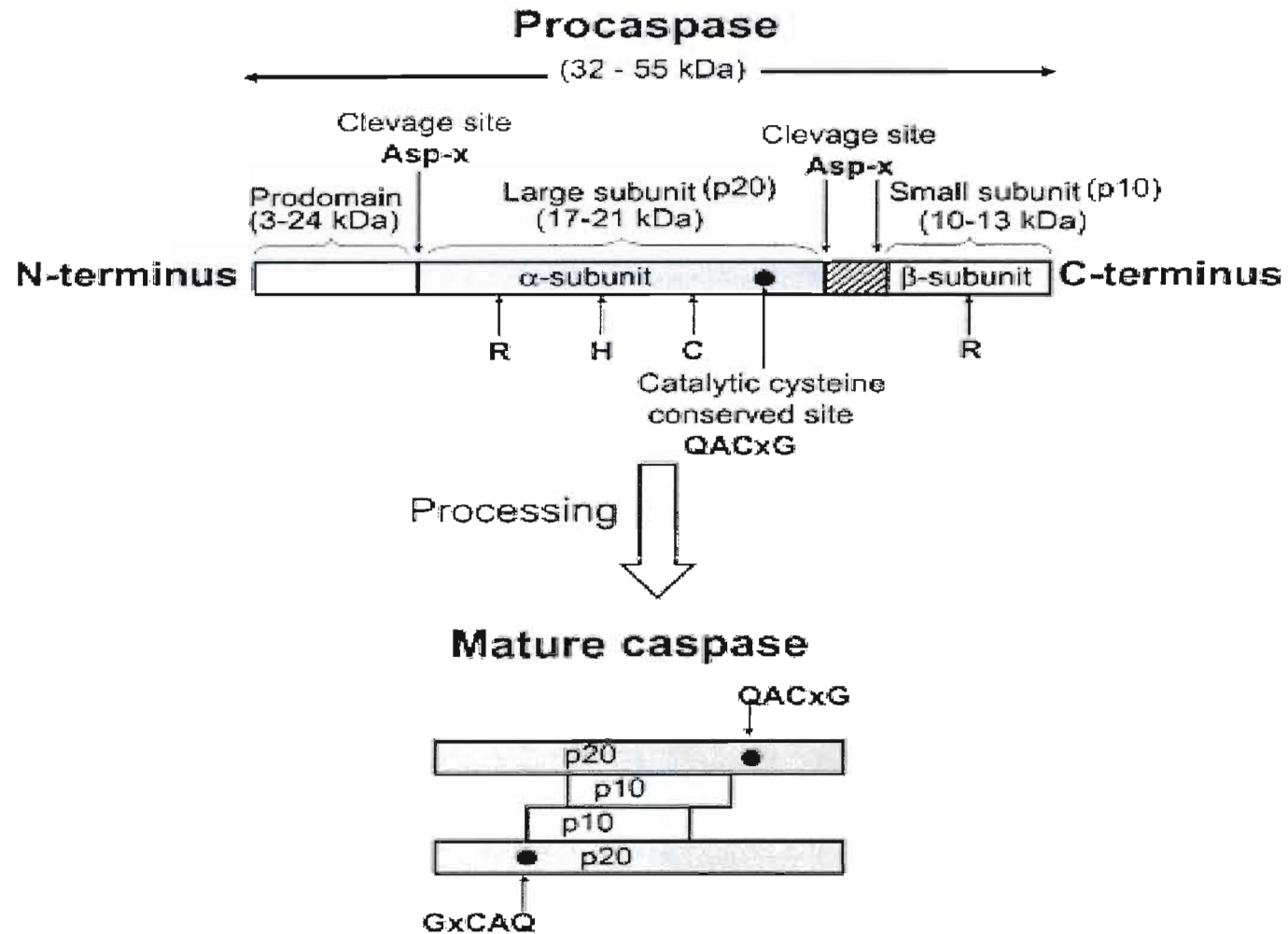


Figure 2.8 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des caspases. La maturation des pro-caspases initiatrices et effectrices est similaire. Les pro-domaines N et C terminaux sont clivés en premier au niveau du site Asp-x. L'assemblage de deux fragments p20 et deux fragments p10 est ce qu'on appelle enzyme active ou caspase. Figure adaptée de Chowdhury et al., 2008.

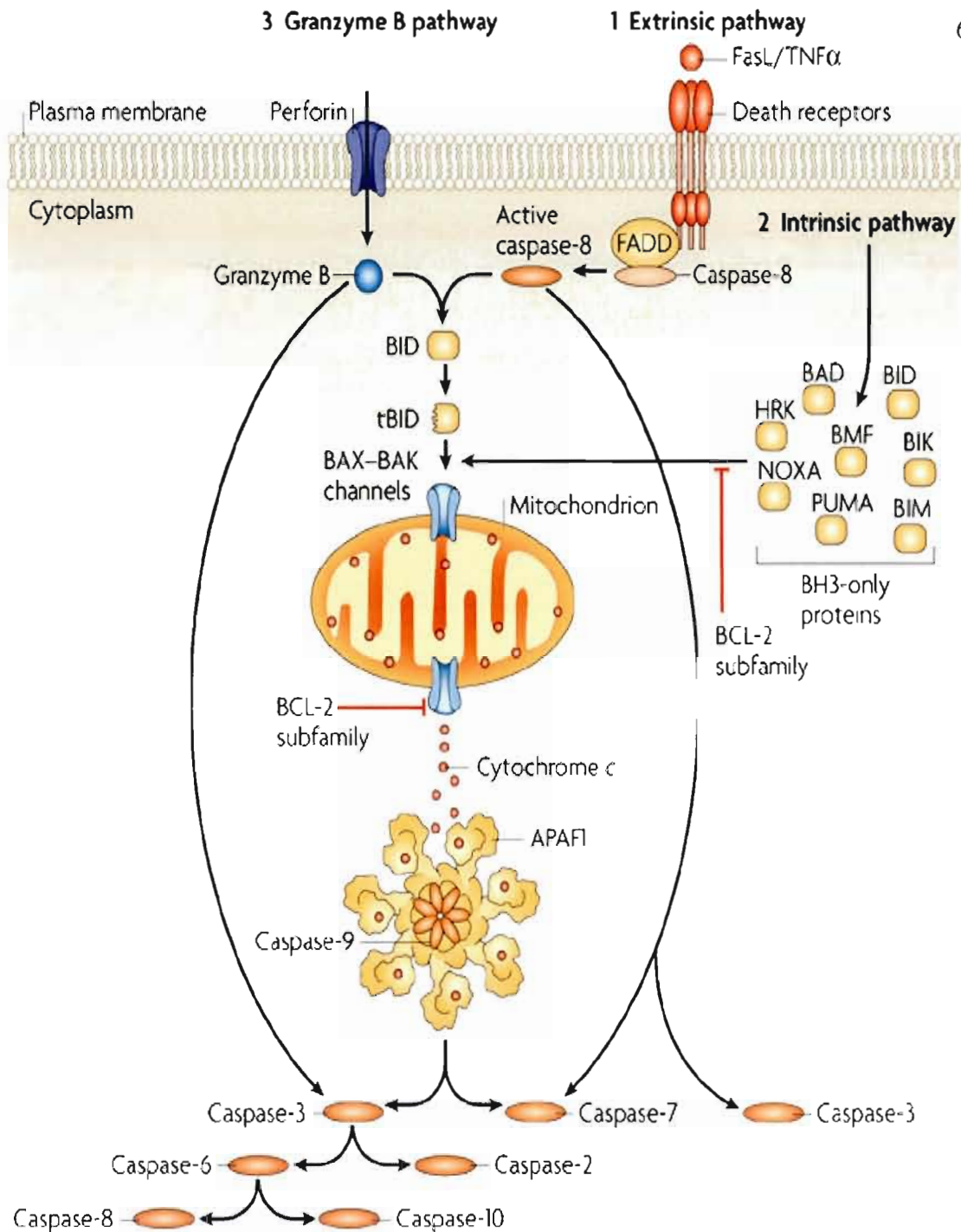


Figure 2.9 : Représentation schématique de l'activation de la cascade de caspases. L'activation de la cascade apoptotique se déroule en deux étapes : les caspases initiateurs sont les premières à être activées par la voie mitochondriale (caspase 9) et/ou la voie des récepteurs de mort (caspases 8 et 10). La caspase 9, activée au niveau de l'apoptosome, va permettre l'activation par clivage en cascade des caspases effectrices (2, 3, 6 et 7). Une fois activées, les caspases effectrices vont cliver un grand nombre de protéines cibles, entraînant une perte ou un gain de fonction de ces protéines et menant ainsi à la réalisation du processus de mort cellulaire. Parmi les caspases effectrices, la caspase 3 est responsable de la majorité des altérations observées durant la phase d'exécution. Figure adaptée de Taylor et al., 2008

2.4.3 Apoptose induite par le réticulum endoplasmique

La majorité des protéines sécrétées et membranaires sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique où elles sont repliées et assemblées avant d'être transportées. Sous certaines conditions cellulaires, des protéines de conformation anormale s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et induisent la réponse connue sous le nom de stress du RE ou "ER stress". Jusqu'à présent, deux principales réponses au stress du RE ont été identifiées. La première connue sous le nom de «réponse aux protéines mal pliées» (pour unfolded protein response ou UPR), permet aux cellules de résister au stress et de survivre alors que la deuxième réponse consiste à activer le processus apoptotique lors d'un stress rigoureux au RE (Schroder 2006).

2.4.3.1 La réponse UPR

La réponse UPR se déroule en trois étapes : la première consiste à activer les gènes codant pour les protéines résidentes dans le RE, afin de rendre la voie sécrétrice plus importante, ceci en augmentant l'activité de repliement des protéines et en évitant leur agrégation (Tableau 2.2). L'activation de ces gènes nécessite également l'arrêt de l'apport en protéines vers le RE, ce qui constitue la deuxième étape. Celle-ci se résume par la baisse du niveau de traduction des protéines afin de réduire leur niveau dans le RE et, par conséquent, empêcher l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE (Schroder 2006; Foufelle and Ferre 2007).

Les voies de signalisation intracellulaire déclenchées durant la réponse UPR sont basées sur l'activation des protéines transmembranaires du RE et sur l'épissage alternatif de l'ARN messager. Ces voies impliquent principalement trois protéines ; Ire1, Hac1p/ATF6 et PERK. La première protéine a un mécanisme d'action similaire aux récepteurs membranaires. En effet, dans les conditions physiologiques normales, la chaperone Bip se trouve liée à ces trois protéines, les maintenant ainsi à l'état

inactif. L'accumulation des protéines à conformation anormale dans la lumière du RE entraîne la dissociation de la chaperone Bip des protéines Ire1 et de la kinase PERK pour se lier aux protéines à conformation anormale. Un tel effet aura comme conséquence l'oligomérisation et l'autophosphorylation en trans de la kinase PERK. Il en résulte la phosphorylation du facteur général d'initiation de la traduction eIF2 α sur son résidu sérine 51, ce qui prévient la formation du complexe d'initiation de la traduction (Bernales, Papa et al. 2006; Sekine, Takeda et al. 2006; Lai, Teodoro et al. 2007).

Tableau 2.2 : Gènes induits par la réponse UPR. (Zhang and Kaufman 2006)

Levures	Mammifères	Séquence carboxy-terminale	Fonction
<i>KAR2</i>	<i>BiP/GRP78</i>	HDEL (levures) KDEL (Homme)	Protéine chaperonne
<i>LHS1</i>		HDEL	Protéine chaperonne/famille des KAR2
<i>ERO1</i>		PRVI	Oxydoréductase
<i>EUG1</i>		HDEL	Echange du pont disulfide
<i>SCJ1</i>		KDEL	Cofacteur pour Kar2p
<i>JEM1</i>		NFGL	Cofacteur pour for Kar2p
<i>INO1</i>		ERLL	Biosynthèse de l'inositol
<i>OPI3</i>		KKNM	Synthèse des phospholipides
<i>CHO1</i>		IPKP	Synthèse des phospholipides
<i>PDI1</i>	<i>PDI</i>	HDEL (levure) KEEL (homme)	Synthèse des phospholipides
<i>FKB2</i>	<i>FKBP13</i>	KSAA (levure) RTEL (homme)	<i>Cis-trans</i> prolyl isomérase
<i>GT</i>		KKNM (levure) REEL (homme)	Glycosylation des protéines à conformation anormale
	<i>GRP94</i>	KDEL	Protéine chaperonne
	<i>GRP170</i>	NDEL	Protéine chaperonne
	<i>ERP72</i>	KEEL	Echange du pont disulfide
	<i>ERP59</i>	KDEL	Echange du pont disulfide
	<i>ERP29</i>	KEEL	Echange du pont disulfide
	<i>HSP47</i>	RDEL	Chaperonne du collagène
	<i>Calreticuline</i>	KDEL	Rétention des glycoprotéines mono-glucosylées
	<i>CHOP/GADD153</i>	LHQA	Induction de la transcription

Dans certaines conditions cellulaires, la quantité de protéines de conformation anormale dans le RE augmente si fortement que l'équipement cellulaire en chaperones et en protéines de dégradation est saturé. Les protéines mal pliées ont tendance à s'accumuler, plaçant les cellules dans une situation où elles sont susceptibles de déclencher la dégradation active des protéines. Ce mécanisme de dégradation, connu aussi sous le nom de «ERAD» (pour dégradation associée au réticulum endoplasmique), est activé suite à la transcription de certaines protéines spécifiques telles que les ligases associées au RE (ex : la protéine ligase Doa10, l'ubiquitine ligase HRD1...) (Figure 2.9). Cette troisième étape de la réponse cellulaire au stress du RE représente un phénomène de dégradation active nécessitant la formation du complexe BiP/Kar2 et la transcription de Hac1. Ceci aura comme conséquence l'induction des différents gènes codants pour les protéines impliquées dans le transport, la glycosylation, le transport vésiculaire et le métabolisme protéique tels que HRD1, HRD3, DER1 et UBC6 (Bernales, Papa et al. 2006; Sekine, Takeda et al. 2006; Lai, Teodoro et al. 2007). Le transport des protéines par le translocon dans le cytoplasme induira leur déglycosylation et leur ubiquitinylation puis leur dégradation par le protéasome 26S (Szegezdi, Logue et al. 2006; Hetz 2007; Scriven, Brown et al. 2007; Toth, Nickson et al. 2007).

2.4.3.2 L'apoptose via la voie du RE

Dans le cas d'un stress rigoureux au RE, les cellules ont tendance à déclencher la deuxième réponse, qui les mènera à l'apoptose. L'apoptose induite par le RE est souvent associée à une augmentation du taux du facteur de transcription nucléaire CHOP/GADD153 (membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP ; (Ron and Habener 1992), de même qu'à la phosphorylation du facteur eIF-2 α (Kaufman 1999). Ces facteurs sont impliqués dans l'activation de la cascade des protéases à cystéines, plus particulièrement les caspases 12 et 4 (Figure 2.10) (Nakagawa, Zhu et

al. 2000). Il faut également noter que l'amplification du taux du facteur CHOP/GADD153 conduit à la baisse du taux des protéines de la famille Bcl-2 dans le cytoplasme et à la sensibilisation de la perméabilité des mitochondries aux protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 (Morishima, Nakanishi et al. 2002; Zhang and Kaufman 2006).

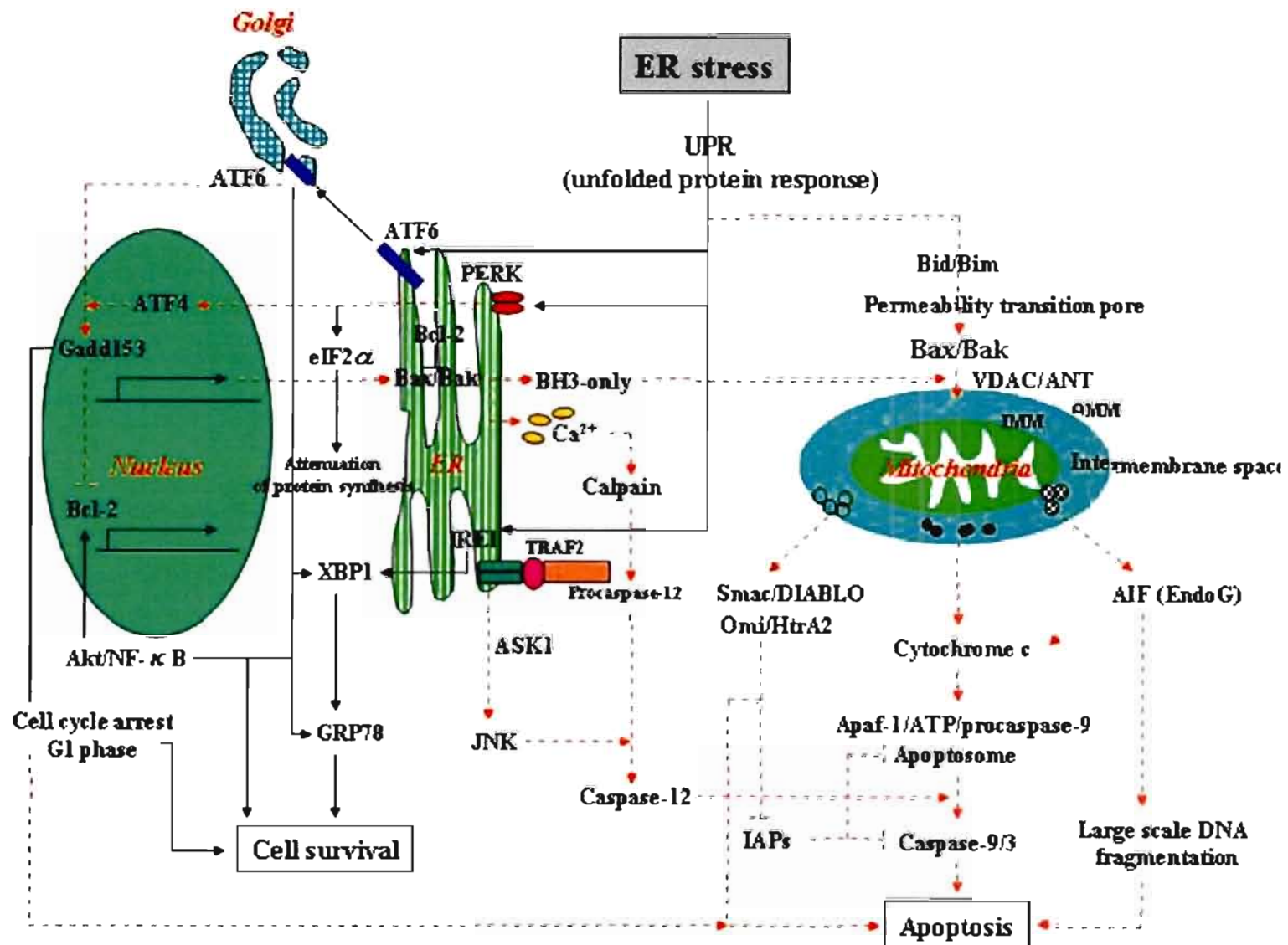


Figure 2.10 : Représentation schématique de l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique. L'apoptose induite par le stress du RE comprend trois voies. La première voie d'induction de l'apoptose par le RE met en jeu la voie de la kinase JNK. En cas du stress du RE, le domaine cytosolique d'IRE1 se lie à la protéine adaptatrice TRAF2 causant ainsi l'activation de la kinase ASK-1 qui va activer à son tour la kinase JNK. Une fois activée, JNK assure la phosphorylation du Bim et sa translocation vers la mitochondrie. Par conséquent une cascade apoptotique Bax dépendante s'active. La deuxième voie apoptotique induite par un stress du RE est basée sur l'activation de la caspase 12. Celle-ci est localisée au niveau de la membrane du RE côté cytosolique. Son activation est assurée par la m-calpaïne ou la translocation de la caspase 7 du cytosol vers la membrane du RE. Le troisième mécanisme d'induction d'apoptose est médiée par la caspase 8 et la protéine Bap31. Cette dernière est une protéine ancrée dans le RE et recrute dans un complexe (comprenant entre autres son homologue Bap29) la procaspase 8 qui peut s'y activer. Une fois activée, la caspase 8 clive aussi Bap31 pour générer un fragment N-terminal pro-apoptotique. Le clivage de la caspase 8 à ce niveau pourrait également affecter l'homéostasie calcique du RE. Le relargage du calcium du RE et sa reprise par la mitochondrie favorise la voie apoptotique cytochrome c dépendante. Figure adaptée de Kim et al., 2006.

La première voie d'induction de l'apoptose par le RE met en jeu la voie de la c-Jun N terminal kinase (JNK). En cas de stress rigoureux du RE, le domaine cytosolique de Ire1 se lie à la protéine adaptatrice 2 associée au récepteur TNF (TRAF2) causant ainsi l'activation de la kinase régulatrice des signaux apoptotiques (ASK-1) qui va activer à son tour la JNK. Une fois activée, JNK assure la phosphorylation de Bim (membre proapoptotique de la famille Bcl-2) et sa translocation vers la mitochondrie. Par conséquent, une cascade apoptotique dépendante de Bax s'active (Urano, Bertolotti et al. 2000) (Figure 2.10).

La deuxième voie apoptotique induite par un stress du RE est basée sur l'activation de la caspase 12. Celle-ci est localisée au niveau de la membrane du RE du côté cytosolique. Son activation est assurée par plusieurs mécanismes, soit entre autre, le clivage protéolytique par les calpaïnes. C'est une endopeptidase cytosolique activée par le calcium, qui induit le clivage protéolytique et donc l'activation de la procaspase 12 ainsi que le clivage et l'inactivation de Bcl-xL (Nakagawa and Yuan 2000). D'autres études ont montré que cette caspase pourrait être également activée suite à la translocation de la caspase 7 du cytosol vers la membrane microsomale (Rao, Hermel et al. 2001) (Figure 2.10).

Le troisième mécanisme d'induction d'apoptose met en jeu la caspase 8 et la protéine Bap31. Cette dernière est une protéine ancrée dans le RE et elle recrute dans un complexe (comprenant entre autres son homologue Bap29) la pro-caspase 8 qui peut s'y activer. Une fois activée, la caspase 8 clive aussi Bap31 pour générer un fragment aminoterminal proapoptotique. Le clivage de la caspase 8 à ce niveau pourrait également affecter l'homéostasie calcique du RE. La libération du calcium du RE et sa reprise par la mitochondrie favorisent la voie apoptotique dépendant du cytochrome c (Momoi 2004).

Les membres de la famille Bcl-2 sont de puissants régulateurs de l'apoptose induite par le RE (Hetz 2007; Toth, Nickson et al. 2007), alors que les membres à multiples domaines BH régulent la sortie du calcium du RE. Les protéines BH3, elles,

servent plutôt à intégrer les signaux apoptotiques provenant des différents compartiments cellulaires et à les transmettre au RE en régulant l'homéostasie calcique. Plusieurs modèles ont été élaborés pour expliquer comment les protéines BH3 pouvaient participer à la régulation de l'apoptose induite suite au stress du RE. Outre Bax, connue pour jouer un rôle dans la perméabilisation de la membrane du RE lors d'un stress de ce dernier, les protéines BH3 seulement, comme Noxa et Puma, sont connues pour être induites d'une façon dépendante de p53. Une fois exprimées, ces protéines migrent vers les membranes du RE et/ou de la mitochondrie pour assurer la libération des différents apoptogènes, y compris le calcium du RE (Figure 2.10). Bik, Bim et Bak sont aussi reconnues comme protéines régulatrices de l'apoptose induite par le RE. La balance entre les pro-apoptotiques activés et les anti-apoptotiques inactivés conditionnerait la libération du calcium du RE (Hetz 2007).

2.4.3.3 Rôle du calcium dans la régulation de l'apoptose

Le calcium est le cation le plus abondant chez les vertébrés (20 à 30 g/kg chez l'homme). La plus grande partie du calcium est fixée par les os où il joue un rôle structural et fonctionnel important. Le calcium est un deuxième messenger intracellulaire impliqué dans une grande variété de fonctions cellulaires comme la contraction musculaire, la sécrétion, la transcription des gènes, la croissance cellulaire et l'apoptose (Verkhatsky 2007; Berridge et al., 1998 ; Meldolesi and Pozzan, 1998 ; Pozzan et al., 1994). Plusieurs organelles subcellulaires sont impliquées dans le stockage du calcium, notamment le réticulum sarcoplasmique, l'appareil de Golgi, la mitochondrie et le noyau (Pozzan, Rizzuto et al. 1994).

Le RE constitue une réserve importante de calcium. L'accumulation du calcium dans le RE se fait contre un gradient électrochimique à l'aide de la pompe calcique nommée SERCA. Le rôle de cette dernière consiste à assurer le transfert des ions Ca^{2+} du cytosol vers le RE suite à l'hydrolyse d'ATP. Dans le RE, le calcium se

trouve soit libre, soit lié à des protéines tampon (calcium-binding proteins).

La mitochondrie est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique et module notamment les signaux calciques issus du RE (Carafoli 2002). L'accumulation du calcium dans la mitochondrie est favorisée par l'élévation transitoire de la concentration calcique cytosolique à proximité des canaux calciques de la membrane cytoplasmique et de la membrane du RE (Figure 2.11). La diffusion rapide de calcium dans le réseau mitochondrial permet donc d'induire rapidement les métabolismes mitochondriaux, entre autres la synthèse d'énergie sous forme d'ATP (Pinton and Rizzuto 2006; Rizzuto and Pozzan 2006).

D'un autre côté, l'implication de l'appareil de Golgi dans l'accumulation du calcium, et l'homéostasie calcique en général, est maintenant clairement définie. Les propriétés des protéines permettant l'accumulation du calcium dans l'appareil de Golgi sont similaires à celles des pompes du RE (Missiaen, Van Acker et al. 2004), suggérant qu'il s'agit d'une pompe calcique de type P, similaire sinon identique à SERCA (Rojas and Moretti-Rojas 2000).

Finalement, le noyau se caractérise lui aussi par un gradient de concentration de calcium, ce qui laisse suggérer que le calcium ne peut pas diffuser librement entre le noyau et le cytoplasme et qu'un système régule l'entrée et la sortie du calcium (Lee, Dunn et al. 1998). De nombreuses études montrent que le calcium est responsable de la régulation de plusieurs événements nucléaires, et que, par conséquent, la régulation de la concentration est d'une importance considérable (Bootman, Thomas et al. 2000). Pour ne citer qu'elles, dans le cytosol, on retrouve des centaines de protéines de type "EF-Hand" comme la calmoduline, la parvalbumine, la calbindine et la troponine C qui jouent un rôle "tampon", et dans le RE on retrouve la calséquestrine, la calréticuline et l'endoplasmine qui présentent à la fois une forte capacité de stockage et une faible affinité pour le calcium.

L'implication du calcium dans le processus apoptotique induit par différents stress

est souvent associée à son rôle dans l'activation de plusieurs protéases et endonucleases. En plus de son rôle dans le clivage et l'activation des calpaïnes, le calcium participe également à l'activation de plusieurs endonucléases dites dépendantes du calcium ou dépendantes du calcium et du magnésium, jouant un rôle dans la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose. Il a été reporté récemment que le calcium peut activer les caspases, notamment la caspase 3 (Bernardi and Rasola 2007; Verkhatsky 2007). Le calcium active également diverses protéines kinases, dont la protéine kinase C, la calmoduline, et la phospholipase A, toutes connues pour jouer un rôle dans l'apoptose (Colomer and Means 2007; Huang and Miller 2007).

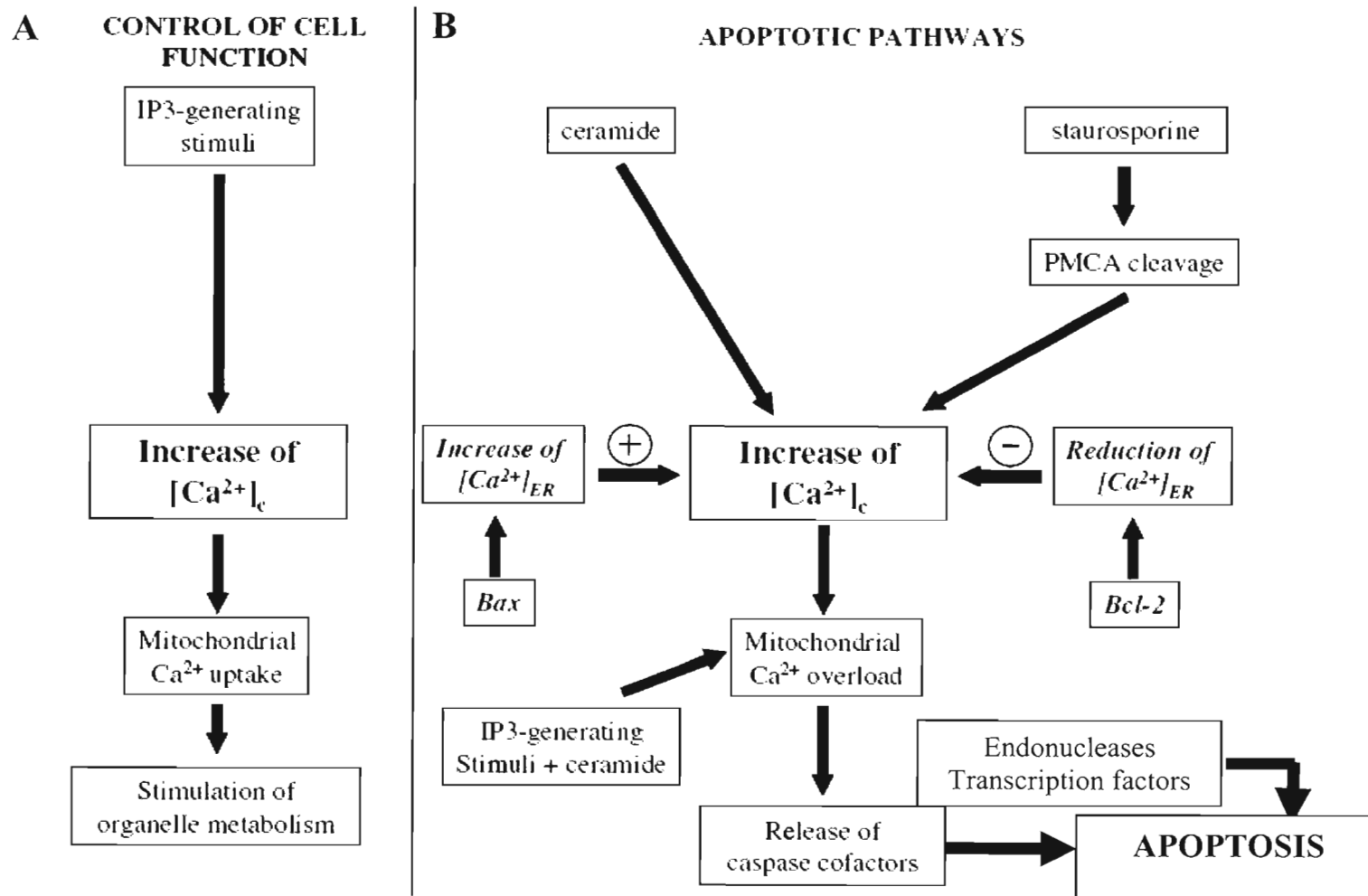


Figure 2.11 : Représentation schématique du rôle du calcium dans la régulation des fonctions cellulaires et l'apoptose : (A) Le calcium est un second messager cellulaire aux bio-propriétés multifonctionnelles. Il est indispensable au fonctionnement de la cellule et à sa réplication et joue un rôle important dans plusieurs processus métaboliques cellulaires; tels que le maintien de l'équilibre basique (acidité/alcalinité) dans les organelles et l'activation de plusieurs enzymes calcium dépendantes. (B) Le calcium joue également un rôle important dans les phases d'induction et/ou d'exécution de la mort cellulaire programmée. Divers stimuli apoptotiques (exemple : céramides et staurosporine) peuvent affecter l'homéostasie calcique qui elle-même peut induire l'apoptose et mener à l'activation des protéases calcium dépendantes (caspases et des calpaïnes). L'accumulation de calcium dans le cytosol suite à la perte de l'homéostasie calcique est souvent la cause de la perméabilisation de la membrane mitochondriale par un déséquilibre du ratio Bax/Bcl-2 et le relargage des divers facteurs pro-apoptotiques, y compris le calcium. Le calcium active également plusieurs facteurs de transcriptions et endonucléases calcium ou calcium/magnésium dépendantes impliqués dans la régulation du processus apoptotique. Figure adaptée de Rizzuto et al., 2003.

2.4.3.4 Rôle des calpaïnes dans la régulation de l'apoptose

Découvertes en 1964 par Guroff, les calpaïnes font partie de la famille des cystéines protéases. Ce sont des enzymes cytoplasmiques, non lysosomales, neutres et dépendantes du calcium (Croall and McGrody 1994). Quinze isoformes ont été trouvées jusqu'à aujourd'hui et elles sont codées par 15 gènes différents désignés par l'acronyme CAPN (Moyen, Goudenege et al. 2004). Les plus représentées des calpaïnes sont la calpaïne 1 et 2 (d'après leur ordre d'élution sur colonne chromatographique de type DEAE). Les noms μ - et la m-calpaïne leur ont été attribués suite à la découverte de la quantité de calcium nécessaire pour leur activation. Elles sont les plus étudiées et font partie du groupe des calpaïnes ubiquitaires présentes dans tous les tissus animaux. À ces calpaïnes, il faut rajouter diverses formes moins conventionnelles issues d'un épissage alternatif, ou de l'absence d'une sous-unité, ainsi que des formes spécifiques d'un tissu donné, comme la calpaïne 3 (p94) qui est spécifique du muscle (Wu, Tomizawa et al. 2007).

2.4.3.4.1 Régulation des calpaïnes

Les calpaïnes sont synthétisées sous forme de proenzymes. L'activation des calpaïnes conventionnelles nécessite une autolyse dépendante du calcium qui est souvent potentialisée par l'interaction avec les phospholipides membranaires (Elce, Davies et al. 1997). La concentration du calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes varie d'une calpaïne à une autre. La calpaïne 1 requiert une concentration de calcium allant de 5 à 50 μ M pour être activée, alors que la calpaïne 2 nécessite de 250 à 1000 μ M de calcium (Ohno, Emori et al. 1984). Il a été rapporté que l'activité intracellulaire des calpaïnes est régulée par son inhibiteur naturel endogène, la calpastatine. La liaison de celle-ci aux calpaïnes est dépendante du calcium. Ainsi, pour que la calpastatine se lie aux calpaïnes, ces dernières doivent être chargées en calcium, mais à un niveau inférieur à celui permettant de les activer (Cottin, Vidalenc

et al. 1981).

Finalement, la phosphorylation des calpaïnes sur l'un des neuf sites de phosphorylation (mais 8 pour la calpaïne 2), localisés majoritairement sur la sous-unité catalytique de 80 kDa, par la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la calmoduline kinase II, la caséine kinase I ou la protéine kinase G, pourrait jouer un rôle potentiel dans leur activation (Shiraha, Glading et al. 2002).

2.4.3.4.2 Rôles des calpaïnes

Les fonctions physiologiques des calpaïnes sont nombreuses et varient d'un tissu à l'autre. Dès lors, elles sont impliquées dans plusieurs événements majeurs de la cellule tels que le cycle cellulaire, la motilité et la fusion cellulaire, la régulation de la transcription, l'apoptose et la nécrose, la gestion du cytosquelette et la régulation des cascades de signalisation. L'inhibition complète de l'expression de la sous-unité régulatrice des formes ubiquitaires est connue pour être létale (Goll, Thompson et al. 2003). La fonction principale des calpaïnes consiste à cliver souvent les liaisons entre deux domaines d'un substrat, provoquant ainsi la perte ou l'acquisition de fonctions et de propriétés spécifiques, plutôt que d'induire une destruction du substrat. Dans ce manuscrit, on s'intéressera uniquement aux calpaïnes ubiquitaires, la μ - et la m-calpaïne.

Par ailleurs, la translocation des calpaïnes du cytosol, où elles résident dans les conditions physiologiques normales, vers la périphérie de la cellule en réponse à un signal cellulaire leur permet d'accomplir ces fonctions variées. Le clivage du cytosquelette est la fonction la plus décrite des calpaïnes (Saido, Suzuki et al. 1993; Wu, Tomizawa et al. 2007). Ainsi, le rôle des calpaïnes dans l'organisation du cytosquelette se résume dans le clivage de plusieurs substrats comme l' α -actinine, la spectrine, la taline, les intégrines et bien d'autres molécules, toutes impliquées dans la liaison de la membrane au cytosquelette et au milieu extra-cellulaire (Goll, Thompson et al. 2003). Les calpaïnes ubiquitaires sont également impliquées dans la migration

cellulaire (Joffroy, Dourdin et al. 2000), dans l'adhésion intercellulaire et la liaison à la matrice extracellulaire (Carragher, Levkau et al. 1999) ainsi que dans la motilité des fibroblastes (Glading, Chang et al. 2000; Glading, Bodnar et al. 2004). De nombreuses études ont rapporté l'implication des calpaïnes dans la progression du cycle cellulaire, soit directement par clivage de protéines régulant le cycle, soit indirectement par protéolyse de substrats cytosquelettiques jouant un rôle dans le cycle cellulaire (Choi, Lee et al. 1997).

Les calpaïnes interviennent aussi au niveau de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Patel, Gores et al. 1996; Solary, Eymin et al. 1998). Son implication dans la mort des cellules neuronales a été démontrée dans plusieurs études. L'équipe de Yoshida, de même que celle de Rajgopal, par exemple, rapportent que la calpaïne 2 joue un rôle potentiel dans la neurodégénérescence due à l'alcoolisme (Yoshida, Sorimachi et al. 1995; Rajgopal and Vemuri 2002). D'autres études menées sur la mort neuronale montrent que les calpaïnes sont activées lors de dommages à l'ADN et favoriseraient l'accumulation de p53 (Sedarous, Keramaris et al. 2003). Contrairement à ces études, d'autres travaux suggèrent une possible implication des calpaïnes dans la division cellulaire car celle-ci semble ralentie, ou même bloquée, par l'addition dans le milieu d'inhibiteurs synthétiques des calpaïnes (Mellgren, Shaw et al. 1994; Zhang, Lane et al. 1996; Zhang and Mellgren 1996; Shoji-Kasai, Itakura et al. 2002).

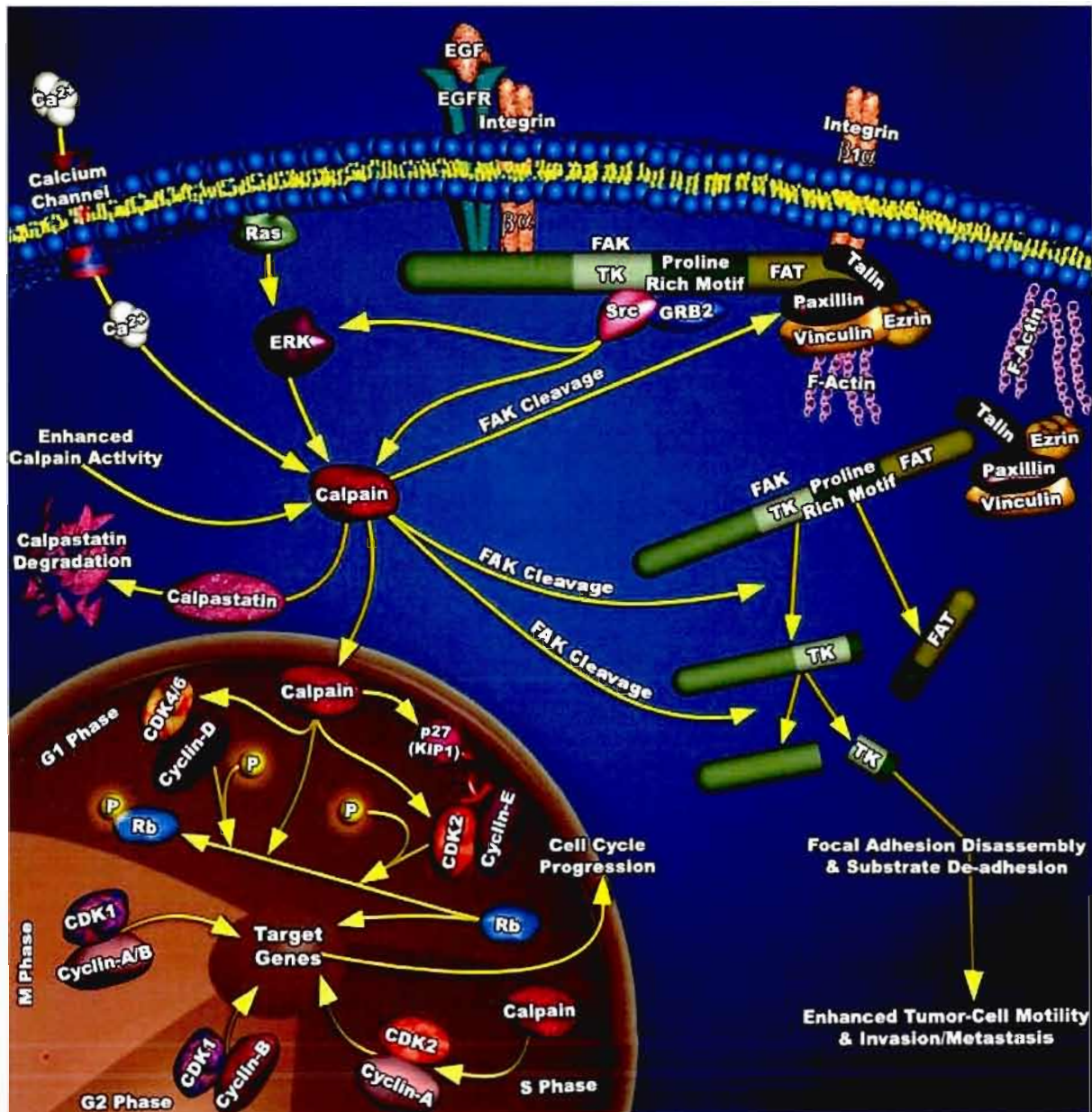


Figure 2.12 : Représentation schématique du rôle des calpaïnes. Les calpaïnes sont des protéases à cystéine, non-lysosomiales, dont l'activité, de type papaine, est dépendante du calcium et du pH. Ces enzymes agissent à pH neutre et sont responsables de la protéolyse calcium-dépendante. Les calpaïnes sont des protéases hétérodimériques et possèdent un domaine leur permettant d'interagir avec le calcium de type EF-hand. Elles sont capables de dégrader de nombreux substrats. Citons en particulier les enzymes, les protéines de structure et de signalisation. <http://www.ambion.com/tools/pathway/pathway/>

2.5 Protéines régulatrices de l'apoptose

Plusieurs autres protéines et facteurs participent à la régulation de l'apoptose et, par conséquent, elles peuvent être à l'origine des maladies liées à une déficience de l'apoptose. La protéine AIF, la protéine c-Flip, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs), la protéine Smac/Diablo et les protéines IAPs, sont des facteurs impliqués dans la régulation des différents stades de l'apoptose (Bernardi and Rasola 2007).

2.5.1 La protéine inductrice de l'apoptose (AIF)

La protéine AIF joue un rôle décisif dans les processus d'apoptose indépendante des caspases et elle est remarquablement impliquée dans la mort apoptotique embryonnaire. C'est une flavoprotéine de 57 kDa qui possède à la fois des séquences de localisation mitochondrial (MLS) et nucléaire (MLS). Dans les conditions physiologiques normales, AIF est localisée au niveau de l'espace intermembranaire des mitochondries. Sa libération dans le cytoplasme et sa migration dans le noyau suite aux stimuli apoptotiques sont connues responsables de la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN à grande échelle. Il a été également démontré qu'AIF joue son rôle pro-apoptotique en causant la libération des protéines apoptogéniques localisées au niveau de la mitochondrie (Kime et al., 2006) (Figure 2.13).

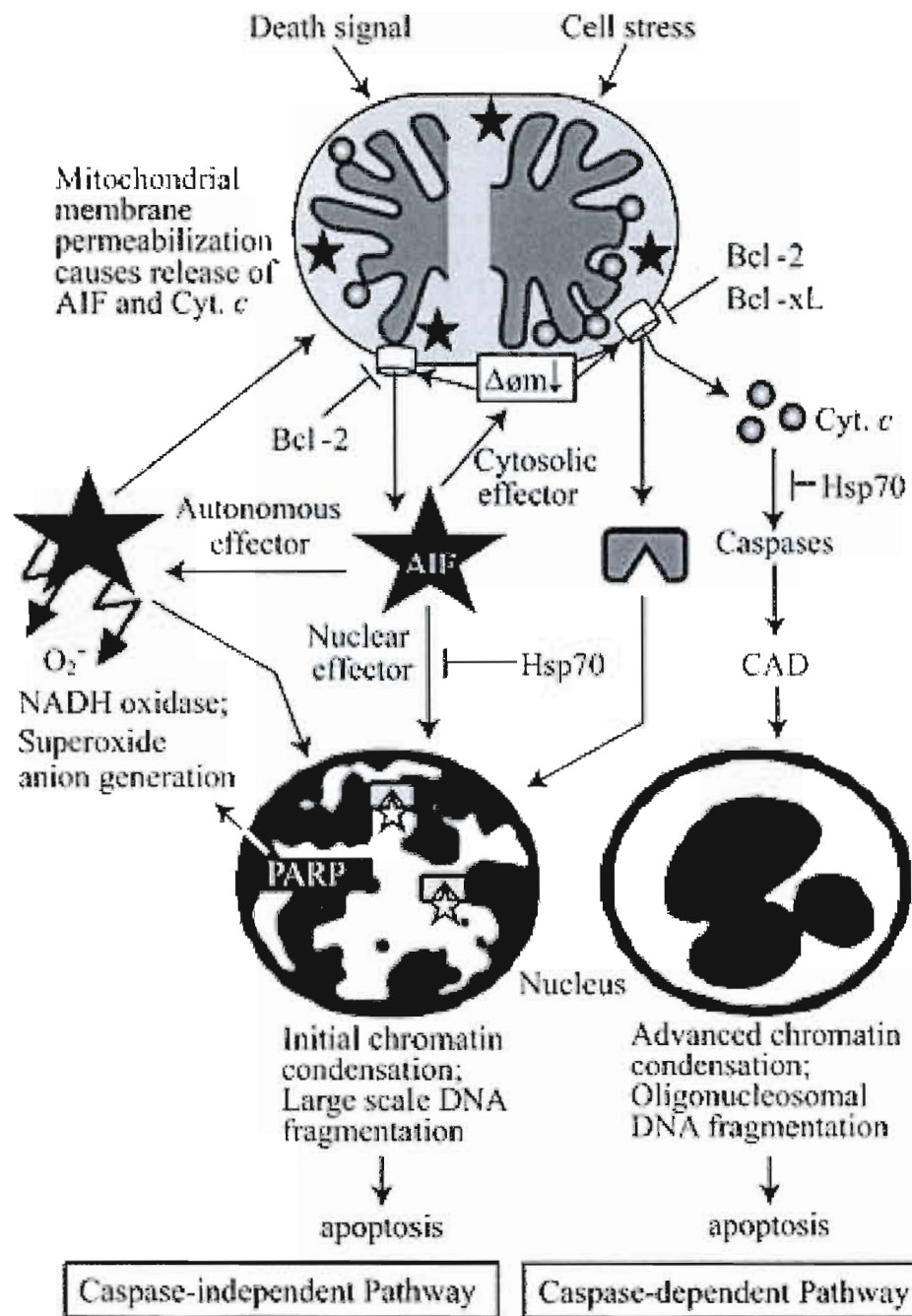


Figure 2.13: Rôle de la protéine AIF dans l'apoptose. Le précurseur de l'AIF (67 kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie. Une fois dans l'espace intermembranaire, la séquence MLS est clivée, la protéine change de conformation tout en incorporant le groupement prosthétique FAD («Flavin Adénine Dinucléotide»). C'est une protéine bifonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle pro-apoptotique. Après exposition de la cellule à un stimulus pro-apoptotique, l'AIF se transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. L'AIF interagit directement avec l'ADN sans spécificité de séquence et engendre une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de l'ADN en larges fragments de 50 kpb. L'AIF est inhibé par la Hsp70 et la protéine Bcl-xL. Figure adaptée de LÜ et al., 2003

2.5.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs)

Cinq homologues de la famille des IAPs ont été identifiés: cIAP1/ HIAP-2/hMIHB, NAIP, cIAP2/HIAP-1/hMIHC, XIAP/hILP et la survivine (Hay, Wassarman et al. 1995). Ces inhibiteurs interviennent à différents niveaux dans la cascade apoptotique en bloquant aussi bien la maturation des caspases initiateurs que celle des caspases effectrices. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 inhibent-elles les caspases 3, 7 et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8 (Deveraux, Roy et al. 1998). La structure des IAPs, à l'exception de la survivine, est caractérisée par la présence de 3 domaines BIRs (pour baculovirus IAP repeats) dans leur partie aminoterminal et d'un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc dans leur partie carboxyterminale. La survivine, par contre, ne contient que les domaines BIRs. Différentes études ont montré que seul BIR2 était requis pour inhiber les caspases 3 et 7 et que le domaine RING n'était pas nécessaire (Takahashi, Deveraux et al. 1998). De plus, il semble que cIAP-1 et cIAP-2 puissent se lier aux facteurs associés au TNF-R1, entre autres TRAF-1 et 2, grâce à leur motif BIR (Roy, Deveraux et al. 1997).

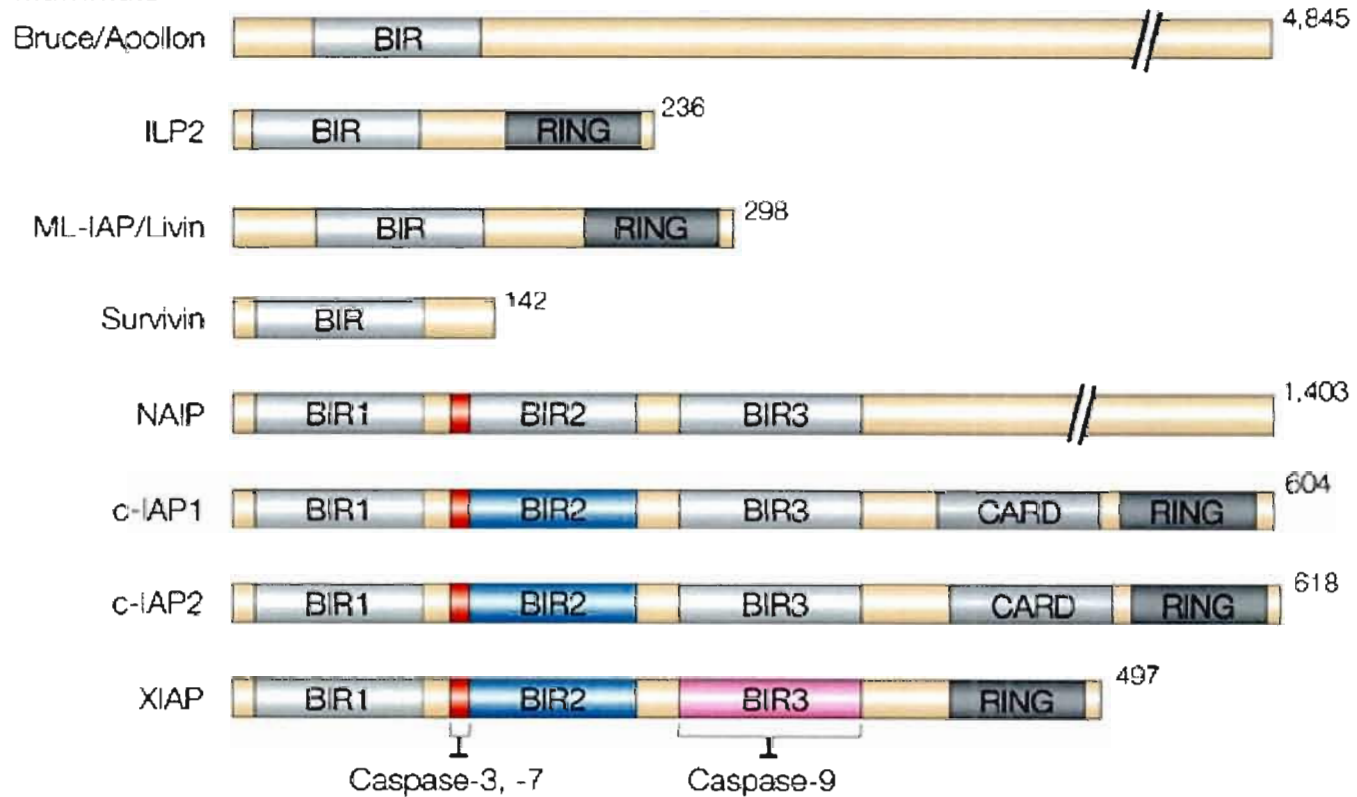
Mammals

Figure 2.14 : Représentation schématique des protéines IAPs. Cette figure schématise les séquences polypeptidiques des 8 membres de la famille IAP actuellement identifiés : X (*X-linked*) IAP, c (*cytoplasmic*)-IAP1, c-IAP2, N (*Nucleotide binding*) IAP, ML (*Melanoma and Lymphoma*) IAP, ILP2 (*IAP-like protein-2*), Survivine, Bruce/Apollon chez les mammifères. Les IAPs sont constituées de différents domaines protéiques dont les domaines BIR (*Baculoviral IAP repeat*) sont indispensables à l'activité anti-apoptotique d'IAP. Chaque domaine BIR possède des fonctions distinctes et une spécificité de liaison aux caspases). BIR-1 et -2 assurent la liaison et l'inhibition de l'activité des caspases 3 et 7 alors que BIR-3 inhibe l'activation et l'activité de la caspase 9. Figure adaptée de Riedl and Shi, 2004.

2.5.2 FLIP

L'étape de formation du DISC peut être régulée par la protéine Flip qui possède deux domaines effecteurs de mort (DED) mais aucun site catalytique actif. Son rôle consiste à inhiber l'activation de la caspase 8 par compétition. En effet, grâce à ses domaines de morts (DED), Flip peut se fixer aux prodomaines des pro-caspases 8, empêchant ainsi leur recrutement aux récepteurs de mort tels que Fas ou TNF-R1 (Irmeler, Thome et al. 1997).

Il existe différents variants transcriptionnels de Flip (Yuan, Shaham et al. 1993; Komiyama, Ray et al. 1994; Bump, Hackett et al. 1995). Seuls deux sont présents au niveau protéique : une forme longue c-FLIPL et une forme courte c-FLIPs. La forme longue possède, en plus des deux DEDs, l'équivalent d'un domaine caspase inactif. La forme courte est formée uniquement de deux DEDs. Toutes les formes résultantes d'un tel épissage de c-Flip sont capables de s'associer à FADD et/ou à la caspase 8, bloquant ainsi la formation du DISC. Toutefois, le mécanisme exact de l'inhibition par Flip reste imprécis, et d'autres éléments sont susceptibles de bloquer la formation du DISC (Krueger, Schmitz et al. 2001).

CHAPITRE III : LES MAP KINASES

Les protéines kinases sont des sérine/thréonine kinases qui possèdent un site de phosphorylation conservé : Thr-X-Tyr. La classification de ces MAP kinases dépend de la nature de l'acide aminé compris dans le motif de phosphorylation. Ainsi, si cet acide aminé est la glycine, la MAP kinase appartient à la famille des kinases p38. L'acide aminé X dans les MAP kinases ERK est le glutamate alors que dans la famille des JNK, c'est une proline. Les MAP kinases partagent entre elles plusieurs propriétés, parmi lesquelles :

1. Une MAP kinase est phosphorylée par une kinase à double spécificité reconnaissant à la fois la thréonine et la tyrosine;
2. Les MAPK sont des kinases « proline-dirigées ». Cependant, les sites de reconnaissance des substrats sont souvent spécifiques à chaque kinase; impliquant ainsi une sélectivité du substrat;
3. Les mécanismes d'activation ainsi que les acteurs impliqués peuvent être communs à plusieurs MAP kinases appartenant à des familles différentes.
4. La spécificité d'une voie de signalisation des MAP kinases est obtenue avec des protéines d'échafaudage capables de lier et séquestrer certaines composantes de la voie et être recrutées par certains types de signaux comme la protéine kinase KSR (pour kinase suppresseur de Ras), JIP1/2 ou la protéine MP1.
5. L'activation des MAP kinases implique un recrutement membranaire d'une MAP3K. Ce recrutement commandera son oligomérisation et sa phosphorylation (Pimienta and Pascual 2007).

L'activation de ces MAP kinases ainsi que leurs fonctions biologiques sont variables et complexes (Figure 3.1). En effet, la même kinase pourrait jouer un rôle dans le maintien de la survie cellulaire comme elle pourrait induire la mort par apoptose. Cette dualité dépend de la nature du stress, de la durée d'exposition, de la dose ainsi

que du type de tissu (tableau 3.1). Le rôle physiologique de chacune de ces MAP kinases sera abordé dans les paragraphes qui suivent. Cependant, dans ce projet, on mettra l'accent sur protéines kinases p38 et JNK. On essaiera également d'investiguer leurs rôles dans le déroulement des divers processus biologiques, en particulier l'apoptose et le cycle cellulaire.

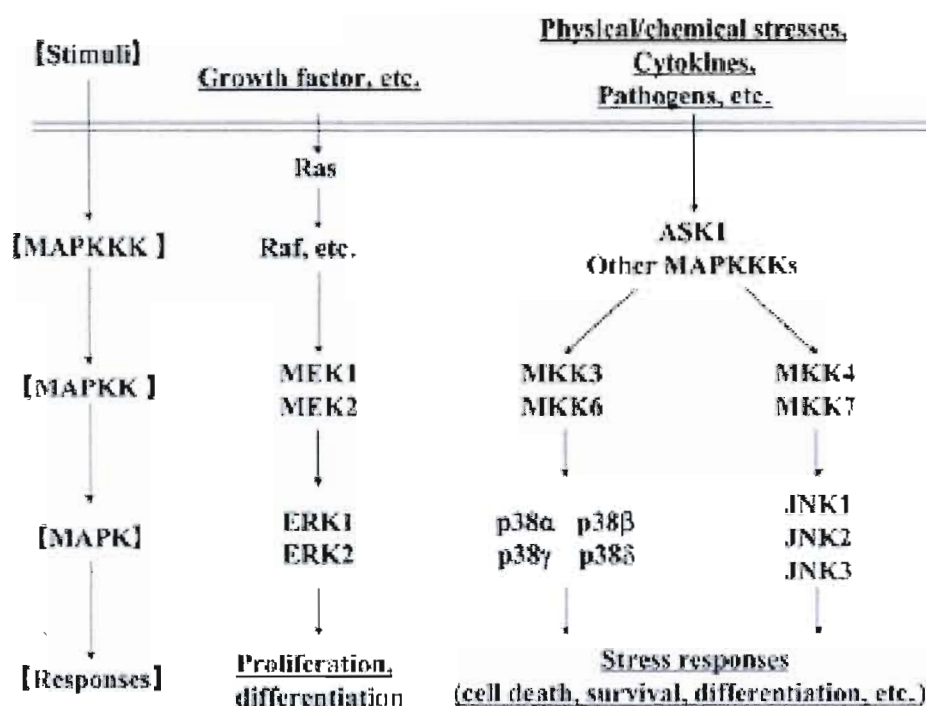


Figure 3.1 : Schéma représentatif des protéines kinases. Les protéines kinases forment des réseaux fortement interactifs pour exécuter, au niveau cellulaire, des fonctions intégrées dans l'organisme. Les voies de transduction des MAP kinases représentent un des systèmes signalétiques primordiaux que la nature utilise dans plusieurs systèmes cellulaires pour accomplir une variété de fonctions tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose, en réponse à une pléthore de stimuli (facteur de croissance, stress physiques et chimiques, cytokines...). Le déroulement de la cascade signalétique débute par l'activation d'une petite GTPase se situant en amont d'un module central constitué de trois kinases : des MAPK kinase kinases qui phosphorylent et activent les MAPK kinases (MAPKK ou MKK exemple : MEK1-2 ; MKK3-7), qui à leur tour, activent et phosphorylent les MAPK (ERK1-7, p38, JNK1-3...). Une fois phosphorylées, les MAP kinases activent et phosphorylent divers substrats impliqués dans diverses fonctions biologiques (Figure adaptée de Nagai, et al., 2002).

Tableau 3.1 : Liste des différents substrats des MAP kinases. Tableau adapté de Edmunds and Mahadevan 2004.

MAPK/ downstream kinase	Transcription factor	Evidence	References
ERK	Elk1	GST pulldown, yeast two-hybrid, CIP	Cano et al., 1995; Yang et al., 1998c; Yang et al., 1998b; Rao and Reddy, 1994
	Ets-1	Affinity chromatography	Seidel and Graves, 2002
	SAP-1	Peptide competition	Galanis et al., 2001
	SAP-2	GST pulldown	Ducrot et al., 2000
	BMAL1	Yeast two-hybrid, GST pulldown	Sanada et al., 2002
	TFII-I	CIP and GST pulldown	Kim and Cochran, 2000
	ANL-1	GST pulldown	Tanaka et al., 1996
	HSF-1	CIP	Dai et al., 2000
	p53	CIP	She et al., 2000
	TIF-IA	Pulldown, CIP	Zhao et al., 2003
	Myc	GST pulldown	Gupta and Davis, 1994
	SP1	CIP	Liu et al., 2001
	TFIIIB (BRF1 subunit)	GST pulldown, CIP	Felton-Edkins et al., 2003
JNK	Elk1	Peptide competition, GST pulldown	Yang et al., 1998b; Gupta et al., 1996
	Jun	GST pulldown, CIP	Kallunki et al., 1996; Adler et al., 1992; Dai et al., 1995; Cano et al., 1995; Read et al., 1997; Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1994; Sluss et al., 1994; Hibi et al., 1993; Denijard et al., 1994
	SAP-2	GST pulldown	Ducrot et al., 2000
	ATF-2	GST pulldown	Livingstone et al., 1995; Gupta et al., 1995; Gupta et al., 1996; Ringeaud et al., 1995
	JunB	GST pulldown	Gupta et al., 1996; Kallunki et al., 1996
	Myc	GST pulldown, CIP	Noguchi et al., 1999
	RAR α , RAR γ	GST pulldown	Adam-Stitah et al., 1999
	TCF β 1	GST pulldown	Kastibhatla et al., 1999
	NFAT4	Yeast two-hybrid, CIP, GST pulldown	Chow et al., 1997
	NFATc1	GST pulldown	Chow et al., 2000
	DP1	GST pulldown, CIP	Wang et al., 1999
	HSF-1	CIP	Dai et al., 2000
	p53	CIP	Fuchs et al., 1998
	GR	CIP, GST pulldown	Bruna et al., 2003
p38	SAP-1	Peptide competition	Galanis et al., 2001
	SAP-2	GST pulldown	Ducrot et al., 2000
	MEF2A	Peptide competition, immune complex kinase assay	Yang et al., 1999; Barsyte-Lovejoy et al., 2002
	MEF2C	Yeast two-hybrid, GST pulldown	Han et al., 1997
	SP1	CIP	D'Addato et al., 2002
	ATF2	GST pulldown, CIP	Ringeaud et al., 1995; Read et al., 1997
	CDX2	GST pulldown, immune complex kinase assay, CIP	Houde et al., 2001
	NFAT	CIP	Gomez del Arco et al., 2000
	p53	CIP	She et al., 2000
	RNA polymerase II	CIP	Alepuz et al., 2003
ERK5	MEF2D	CIP, GST pulldown, mammalian two-hybrid	Kasler et al., 2000; Yang et al., 1998a
	MEF2C	GST pulldown, CIP	Yang et al., 1998a
	MEF2A	CIP	Yang et al., 1998a
MSK1	p65 (NF- κ B)	GST pulldown, CIP	Vermeulen et al., 2003
RSK	ER81	CIP, GST pulldown	Wu and Janknecht, 2002
	Mt	CIP	Wu et al., 2000
	TIF-IA	Pulldown, CIP	Zhao et al., 2003
	ER α	CIP	Joel et al., 1998
MAPKAPK2	E47	CIP	Neufeld et al., 2000
Mnk2	ER β	Mammalian two-hybrid	Slentz-Kesler et al., 2000

A non-comprehensive list of stable interactions between mammalian MAP kinases and transcription factors and some of the supporting evidence. CIP, co-immunoprecipitation.

3.1 La voie des JNKs

On les appelle JNK en raison de leur propriété à lier la portion amino-terminale de la protéine c-Jun conduisant à sa phosphorylation sur deux de ses sérines. Elles sont codées par trois gènes. Les gènes *Jnk1* et *Jnk2* sont exprimés de façon ubiquitaire. En revanche, le gène *Jnk3* a un modèle d'expression plus limité : il est majoritairement exprimé dans le cerveau, le coeur et les testicules. Ces gènes subissent un épissage alternatif, donnant naissance à dix isoformes de JNK (Gupta, Barrett et al. 1996). Les protéines résultant de la transcription des trois gènes sont des protéines avec ou sans région carboxyterminale et de poids moléculaires de 46 et 55 kDa, respectivement. La signification biologique de l'épissage alternatif de ces trois gènes est la production d'isoformes possédant des sites d'ancrage des substrats avec une affinité sélective différente d'un isoforme à un autre (Gupta, Barrett et al. 1996; Tanoue, Adachi et al. 2000).

3.1.1 Rôle pro-apoptotique des JNKs

La voie des JNKs est une voie importante pour plusieurs processus biochimiques au niveau des cellules. Bien qu'elle soit évidente, l'implication de la voie de JNK dans l'apoptose induite par divers stimuli (stress oxydatif, céramides, choc thermique...) est encore mal élucidée. De plus, dans d'autres études, la JNK est décrite comme anti-apoptotique. En effet, la phosphorylation de plusieurs protéines pro-apoptotiques comme BAD par JNK résulte en leur inactivation. Pour résoudre cette nuance, on a récemment proposé deux hypothèses pour expliquer comment l'activation de JNK peut contribuer à l'apoptose. Ces deux hypothèses sont fondées sur le seuil d'activation de JNK. La première hypothèse suggère que JNK pourrait induire l'apoptose via certains membres de la famille Bcl-2 (comme Bim, Bcl-2 et Bcl-XL), sans pour autant induire une dépolarisation membranaire ni la libération du cytochrome C (Davis 2000; Lei and Davis 2003). Dans la deuxième hypothèse, on

sollicite la durée d'activation de la JNK durant l'arrêt du cycle cellulaire, ce qui conduira les cellules à la mort par apoptose.

Ainsi on a montré qu'en l'absence d'activation du facteur NF- κ B, l'activation prolongée de JNK contribue à l'apoptose induite par le TNF- α (Papa et al., 2004). De même, l'activation de la voie JNK suite à une surexpression de la MEKK1 était à l'origine de la mort par apoptose (Xia, Dickens et al. 1995; Le-Niculescu, Bonfoco et al. 1999). D'un autre côté, l'activation de la voie JNK via ASK-1 conduit à la phosphorylation de Bcl-2, ce qui réduit l'effet anti-apoptotique de cette kinase (Lin 2003). JNK est également impliquée dans l'apoptose induite par les radiations UV et le facteur de croissance neuronale NGF (Chen and Davis, 1999 Maundrell, Antonsson et al. 1997; Yamamoto, Ichijo et al. 1999; Yu, Minemoto et al. 2004). Il est probable que cette action pro-apoptotique soit médiée par c-Jun puisque l'inactivation de celle-ci, soit par des anticorps, soit par l'expression d'un mutant non phosphorylable, empêche l'apoptose induite par NGF dans des cellules neuronales (Ham, Babij et al. 1995). De même, la surexpression de c-Jun a eu comme conséquence l'induction de l'apoptose dans des neurones sympathiques (Ham, Babij et al. 1995). Malgré la diversité de ces études, le mécanisme moléculaire par lequel c-Jun favorise la fonction proapoptotique de JNK reste à élucider.

3.1.2 Rôle anti-apoptotique des JNKs

JNK n'est pas une protéine kinase majoritairement pro-apoptotique puisqu'on a démontré son implication dans le maintien de la viabilité des cellules neuronales du cerveau des souris et des cellules T. En effet, des cellules T déficientes en JNKK1 (*Jnkk1^{-/-}*) sont plus sensibles à l'apoptose induite par les récepteurs Fas/CD95 ou CD3 (Nishina, Fischer et al. 1997). JNK peut fonctionner également comme protéine kinase anti-apoptotique dans certaines tumeurs. En effet, l'expression de l'oligonucléotide spécifique anti-sens de JNK (JNKAS), dont le rôle est d'empêcher l'activation de JNK, favorise l'apoptose dans certains types de cellules tumorales

(Bost, McKay et al. 1997; Potapova, Anisimov et al. 2002). Selon ces études, cette fonction anti-apoptotique peut être expliquée par l'inhibition de l'effet de p53 sur le déroulement du cycle cellulaire. Cependant, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer si l'action anti-apoptotique de JNK est directe ou si elle nécessite l'intervention d'autres protéines kinases.

3.2 Voie des p38

La p38 a été décrite la première fois comme une protéine rapidement phosphorylée au niveau de son résidu tyrosine en réponse à la stimulation par les endotoxines (Han, Lee et al. 1993; Rouse, Cohen et al. 1994). Le clonage de son ADN a permis de démontrer que cette protéine joue un rôle important dans l'inhibition de la biosynthèse de plusieurs cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ et l'interleukine 1. Chez les mammifères, p38 (dont 4 isoformes ; $\text{p38}\alpha$, $\text{p38}\beta$, $\text{p38}\delta$, et $\text{p38}\lambda$ ont été identifiées) est l'orthologue de la kinase HOG chez la levure. $\text{p38}\alpha$ et $\text{p38}\beta$ sont omniprésentes tandis que l'expression des deux autres formes est limitée à certains tissus. La voie des p38 est activée par phosphorylation de la thréonine 180 et de la tyrosine 182 par les kinases MKK3 et SEK. p38 ainsi activée, phosphoryle à son tour et active la MAPKAP-kinase 2 et le facteur de transcription ATF-2. Toutes les kinases p38 sont activées par une double phosphorylation de leur motif Thr-Gly-Tyr; TGY (Rincon 2001). Elles partagent environ 60 % d'homologie entre elles, et entre 40 et 45 % avec les autres membres de la famille des MAP kinases.

Les p38 jouent les mêmes rôles chez tous les mammifères. Leur activation survient en réponse à des stimuli extracellulaires divers tels que les rayons UV, le choc thermique, le choc osmotique, le stress oxydatif (H_2O_2), les cytokines inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$ et l'interleukine 1) et les facteurs de croissance (Csf-1) (Freshney, Rawlinson et al. 1994; Lee, Laydon et al. 1994; Raingeaud, Gupta et al. 1995; Foltz, Lee et al. 1997). Cette pléthore d'activateurs montre la complexité de la voie des p38 qui dépend non seulement des stimuli mais également de la cellule elle-

même. Par exemple, l'insuline peut stimuler p38 dans les adipocytes 3T3-L1 (Sweeney, Somwar et al. 1999), mais elle l'inhibe dans les neurones cérébraux des poussins (Heidenreich and Kummer 1996). La famille p38 MAPK est souvent associée à l'apoptose, mais il semblerait que son rôle soit beaucoup plus complexe et souvent controversé.

3.2.1 Substrats de protéine kinase de p38

Le premier substrat de p38 identifié a été la protéine kinase 2 activée par les MAP kinases (MAPKAPK2 ou MK2) (McLaughlin, Kumar et al. 1996). L'activation de ce substrat ainsi que son homologue MK3 s'est avérée indispensable pour l'activation de plusieurs autres facteurs tels que la HSP 27 (Stokoe, Campbell et al. 1992), la protéine lymphocyte-spécifique 1 (LSP1) (Huang, Zhan et al. 1997), la protéine de liaison à l'élément répondant à l'AMPc, désignée par son acronyme CREB (Tan, Rouse et al. 1996), le facteur activateur de transcription ATF1 (Tan, Rouse et al. 1996), le facteur de réponse au sérum SRF (Heidenreich, Neininger et al. 1999) et la tyrosine hydroxylase (Thomas, Haavik et al. 1997). La protéine kinase d'interaction avec les MAP kinases MNK, désignée par son acronyme MNK1, est un autre substrat de la p38 dont la fonction est l'initiation de la traduction via le facteur eIF- α (Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997). De même, la kinase PRAK de p38 est un substrat de la p38 α ou/et de p38 β . Elle présente entre 20 et 30 % d'homologie avec MK2 et participe à la régulation de l'activité de la HSP 27 (New, Jiang et al. 1998). La voie p38 semble également réguler la phase S du cycle cellulaire via la régulation de l'activité de l'histone 2B (Deak, Clifton et al. 1998). La protéine kinase p38 peut également phosphoryler d'autres protéines kinases comme MSK1 ou plusieurs facteurs de transcription tels que ATF1, 2 et 6, la protéine accessoire de SRF (Sap1), le facteur CHOP/GADD153, la protéine p53, les facteurs MEF2C, MEF2A, MITF1, DDIT3, ELK1, NFAT, et la protéine 1 de la mobilité HBP1 (Whitmarsh, Yang et al. 1997). Outre les facteurs de transcription, p38 peut

phosphoryler d'autres protéines jouant un rôle important dans de nombreux processus biochimiques de la cellule tels que la protéine Tau, l'isoforme échangeur Na^+/H^+ (Nhe-1), la kératine 8 et la phospholipase A2 (PLA2) (Zhang, Liang et al. 2007). Devant une telle pléthore de cibles et de substrats, il devient évident que la voie des p38 peut jouer une multitude de fonctions souvent complexes et contradictoires.

3.2.2 Rôle de la p38 dans l'expression génique

Grâce à l'utilisation de mutants inactifs ou, au contraire, constitutivement actifs de MKK3 et de MKK6, ainsi que celle de l'inhibiteur SB203580 de la p38, de nombreux gènes régulés par cette kinase ont été identifiés. Ces gènes contrôlent l'expression de plusieurs groupes de protéines incluant les facteurs de transcription, les cytokines et les récepteurs membranaires. Comme cela a été mentionné précédemment, environ la moitié des substrats de la p38 sont des facteurs de transcription. Il s'avère donc que p38 joue un rôle dans l'expression des gènes lors de la transcription. La réponse inflammatoire, par exemple, nécessite l'activation de la transcription des gènes de l'interleukine 1 et 6 et du TNF, or l'activation de ces deux gènes nécessite l'intervention de la p38 (Prichett, Cohen et al. 1995; Kotlyarov, Neininger et al. 1999).

L'implication de la voie des p38 dans les réponses inflammatoires est illustrée également via l'expression de la cyclooxygénase COX-2 assurant le remodelage des tissus suite aux stress patho-physiologiques (Pocock and Liddle 2001). De même, p38 intervient dans l'expression d'autres enzymes impliquées dans l'inflammation comme la iNOS, dans l'expression des protéines régulatrices de l'oxydation ou des protéines d'adhérence (Da Silva, Pierrat et al. 1997; Craxton, Shu et al. 1998).

La voie des p38 est également impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules du système immunitaire en contrôlant l'expression de plusieurs autres protéines telles que GM-CSF, OEB, CSF et CD40 (Kummer, Rao et al. 1997).

3.2.3 Rôle biologique des p38

L'implication de la p38 dans le processus apoptotique est confirmée. En effet, il a été démontré que p38 est impliquée dans l'apoptose induite par Fas et NGF (Juo, Kuo et al. 1997). Certaines études ont montré que la p38 agit en aval de l'activation des caspases puisque l'inhibition de ces protéases peut bloquer l'activation de p38 (Huang, Zhan et al. 1997). Cependant, la surexpression de MKK6b actif dominant peut également induire l'activité des caspases et donc la mort cellulaire par apoptose, suggérant que la p38 agit également en amont des caspases (Cardone, Salvesen et al. 1997). Contrairement à ces études, d'autres travaux ont démontré l'implication de cette kinase dans le maintien de la survie, la croissance et la différenciation cellulaire. La participation de p38 α dans la croissance cellulaire a été observée chez la levure et les mammifères (Takenaka, Moriguchi et al. 1998). La surexpression de p38 α chez la levure a mené au ralentissement significatif de la prolifération tandis que le traitement des cellules mammifères avec l'inhibiteur SB203580 a causé le ralentissement de la prolifération. Ces mêmes études ont montré que cette kinase est impliquée dans le contrôle des phases G1 et G2/M du cycle cellulaire (Molnar, Theodoras et al. 1997; Han and Sun 2007). D'autre part, l'arrêt en G1 des cellules NIH3T3 provoqué par une micro-injection de Cdc42 s'est avéré dépendant de p38 α (Wang, Wang et al. 2000). Pour expliquer ceci, Ye et ses collaborateurs ont proposé un modèle de contrôle impliquant deux substrats de la p38 : HBP1 et p21 (Ye, Yano et al. 2004). Ce modèle suggère que HBP1 a une action similaire à celle de la protéine du retinoblastome (pRb) qui consiste à réguler négativement l'expression des gènes de contrôle de la phase G1.

En dépit de la non-viabilité des souris invalidées génétiquement pour p38, l'implication de cette kinase dans l'embryogenèse et le développement des blastocystes est certaine. Cette voie est également impliquée dans la régulation de l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation des érythrocytes ou érythropoïèse (Natale, Paliga et al. 2004; Madan, Calder et al. 2005).

La p38 joue également un rôle important dans la différenciation cellulaire. Plusieurs études ont élucidé l'importance de cette kinase, en particulier p38 α toute seule ou en présence de p38 β , lors de la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes, des cellules PC12 en neurones et des cellules SKT6 en cellules myéloïdes (Li, Yu et al. 2000). Ces processus de différenciation nécessitent une interaction entre la voie des p38 et celle de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3 kinase)/Akt (Iwasa, Han et al. 2003). La voie de signalisation des p38 favorise également la différenciation des myocytes via la voie de signalisation calcineurine/NFAT (Tongers, Fiedler et al. 2004).

3.3 Les kinases ERK1 et 2

Il y a moins de 15 ans, la recherche des protéines kinases activées dans les cellules stimulées par le facteur de croissance a mené à la purification d'une protéine kinase dite protéine 2 associée aux microtubules (Seger, Seger et al. 1992). C'est une protéine sérine/thréonine kinase de 11 domaines (I à XI), ayant de fortes similitudes avec une protéine régulant le cycle cellulaire chez les levures (Adams, Sachs et al. 2002; Adams and Sweatt 2002). Des expériences d'amplification ont permis d'identifier huit membres de cette famille (ERK1-8). ERK1 et ERK 2 sont les principales ERK étudiées et documentées. Cet intérêt concurrent est dû à leur expression répandue et leurs structures hautement conservées au cours de l'évolution (Seger, Seger et al. 1992). En outre, elles interviennent dans plusieurs processus biologiques incluant la survie, la prolifération, l'hypertrophie ou la différenciation des cellules, comme des études utilisant des mutants ou des inhibiteurs spécifiques de cette voie l'ont prouvé (Shapiro, Vaisberg et al. 1998). ERK1 et ERK2 sont à 90 % identiques (Seger, Seger et al. 1992). Une double phosphorylation d'un résidu thréonine et une autre tyrosine dans leur site catalytique est à la base de toute activité de la cascade d'ERK (Mody et al., 2001). De plus, ERK1 et ERK2 sont généralement activées dans les mêmes circonstances, expliquant ainsi l'implication de la même

kinase (MKK1 ou MEK1) agissant en amont de ces deux kinases pour les activer (Borsch-Haubold, Pasquet et al. 1998; Pereira, Carvalho et al. 2002).

3.3.1 Propriétés d'ERK1/2

L'activation des protéines ERKs survient suite à des stimuli de prolifération et de stress cellulaires tels que les LPS, TNF, fMLP, CSF-1, M-CSF, IFN γ (Khavari and Rinn 2007; Meloche and Pouyssegur 2007). Leur cascade d'activation consiste en une séquence de trois protéines kinases, dont deux agissent en amont d'ERK1/2. Il s'agit de :

1. La sous-famille Raf de MAP3Ks qui est formée par trois protéines : c-Raf-1, A-Raf et B-Raf;.
2. La sous-famille MEK de MAPKK formée par MEK1 et MEK2 (McCubrey, May et al. 2000);

Le signal d'activation peut se manifester en amont de Raf, par exemple à travers l'interaction avec Ras (ou p21), une petite protéine G couplée à une molécule GDP (Ras/GDP) à l'état inactif, et à Ras/GTP quand elle est active. Au même niveau, on peut trouver d'autres protéines comme la PKC (McCubrey, May et al. 2000) ou la protéine suppresseur de tumeur KSR qui jouent le rôle de protéines d'échafaudage des différents membres de la cascade Ras, Raf, MEK et ERK, amplifiant ainsi la transduction du signal.

ERK1 et ERK 2 ciblent plusieurs protéines comme les facteurs de transcription tels que CREB (ERK1/2 doivent être transloqués dans le noyau pour les phosphoryler), des protéines de la même cascade ERK (comme Raf et MEK), constituant ainsi un mécanisme de contrôle en retour, ou *feedback*, négatif et des protéines structurales du cytosquelette (les neurofilaments et les protéines associées aux microtubules). ERK1 et 2 peuvent également être impliquées dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires suite à des interactions protéines-protéines. En effet, outre leur activité kinasique, elles assurent la stimulation de la prolifération et la

survie cellulaire, la transformation néo-plastique, la différenciation neuronale et la plasticité. À titre d'exemple, on cite l'interaction ERK/MKPs ou ERK/topoisomerase II (Shapiro, Whalen et al. 1999). Ce genre d'interaction est souvent favorisé par des protéines d'échafaudage tels que la MP-1 (Shapiro, Whalen et al. 1999) et il dépend étroitement de leur localisation sub-cellulaire.

3.3.2 Implication d'ERK1/2 dans les mécanismes de survie cellulaire (rôle anti-apoptotique d'ERK1/2)

Les premières recherches rapportent une action anti-apoptotique des MAP kinases de la famille ERK1/2 dans des cellules neuronales PC12 différenciées. En effet, il a pu être montré que le facteur de croissance NGF est responsable de l'activation de la voie ERK1/2 (Vaudry, Stork et al. 2002) et que la surexpression des mutants MKK1 a pu anticiper l'apoptose induite par la déplétion en NGF. D'autres études ont démontré que l'activation d'ERK1/2 peut également protéger contre l'apoptose induite par l'ischémie cérébrale et la déprivation en facteur trophique des cellules granulaires du cortex cérébelleux. Dans les cellules rétiniennes ganglionnaires de rat ou les cellules granulaires du cortex cérébelleux, l'effet protecteur d'ERK1/2 a été observé durant l'apoptose induite par le facteur neurotrophique BDNF (Villalba, Bockaert et al. 1997; Bonni, Brunet et al. 1999; Corominas, Roncero et al. 2007), ou par la signalisation d'AMPc déclenchée par les neuropeptides PACAP ou la forskoline (Monaghan, Mackenzie et al. 2008; Wang, Yang et al. 2008). Toutefois, plusieurs autres études, via l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques et des divers mutants d'ERK1/2, ont suggéré qu'ERK1/2 peuvent ne pas être les médiateurs principaux de la neuro-protection contre la cytotoxicité des neurotrophines, le facteur de croissance mimétique de l'insuline IGF-1 ou la dépolarisation membranaire dans des neurones déplétées des facteurs trophiques (Hetman and Xia 2000). Par ailleurs, ces résultats ne sont pas assez clairs vu la multitude des cellules neuronales utilisées à cette fin.

Cependant, il demeure évident qu'ERK1/2 joue un rôle primordial dans la protection des cellules neuronales contre l'apoptose causée par des dommages à l'ADN (Stewart 1994; Anderson and Tolkovsky 1999). Dans ces études, des dommages à l'ADN ont été induits par les médicaments anticancéreux génotoxiques comme la camptothécine ou le cisplatine. La protection contre l'apoptose induite par l'un ou l'autre de ces composés a été inhibée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de MKK1/2 comme le PD98059 ou le SL327 (un composé semblable à U0126). Dans des cellules surexprimant la forme constitutivement active de MKK1, on a observé une résistance à la camptothécine ou à la cisplatine CPDD, suggérant ainsi que l'activation d'ERK1/2 est nécessaire pour la protection contre l'apoptose (Stewart 1994; Anderson and Tolkovsky 1999). De même, plusieurs études ont illustré le fait qu'ERK1/2 puisse servir de médiateurs aux agents qui protègent contre d'autres formes de dommages cellulaires, entre autres l'excitotoxicité, la surcharge en calcium, le stress oxydatif, l'hypoxie ou les infections virales. À titre d'exemple, ERK1/2 s'est avérée indispensable pour la cyto-protection contre l'excitotoxicité du glutamate (Fernandez-Gomez, Pastor et al. 2006; Elliott-Hunt, Pope et al. 2007).

Par ailleurs, Les neurones répondent aux dommages des cellules par l'activation de la mort cellulaire par apoptose. Cependant, en même temps, les cellules peuvent mobiliser des mécanismes de défense afin d'essayer d'éviter la mort et permettre la réparation des dommages. Par exemple, l'activation d'ERK1/2 semble évidente dans ces mécanismes de neuro-protection contre l'apoptose induite par des lésions de l'ADN causées par la camptothécine, le CPDD ou l'etoposide dans les neurones corticaux de l'hippocampe, ou le stress oxydatif (Stewart 1994; Anderson and Tolkovsky 1999; Gonzalez-Zulueta, Feldman et al. 2000). Dans ces études, l'activité d'ERK1/2 a atteint un niveau semblable à celui observé chez des cellules exposées au BDNF. D'autres expériences ont indiqué que dans les cellules exposées au CPDD, l'activation d'ERK1/2 est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP) (Cohen-Armon 2007). Ceci suggère qu'ERK1/2

peut activer PARP afin de préserver le matériel génétique.

La voie ERK1/2 peut cibler plusieurs protéines afin de préserver la viabilité cellulaire. Parmi ces protéines, on cite les facteurs de transcription CREB qui pourraient stimuler la production des médiateurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bag-1 (Zhou, Gray et al. 2005). En outre, ERK1/2 peut également cibler directement plusieurs médiateurs proapoptotiques tels que Bim40 et Bad afin de les inactiver (Biswas and Greene 2002). De même, la voie ERK1/2 pourrait inactiver l'action proapoptotique de la kinase GSK3 (Farmer 2005). Elle pourrait cibler également d'une manière indirecte d'autres protéines jouant un rôle important dans l'apoptose. De façon subséquente, l'activation d'ERK1/2 peut conduire à :

1. L'augmentation du taux des protéines c-Flip afin de prévenir l'activation de la caspase 8 (Wang, Prince et al. 2002).
2. L'augmentation du taux de la cyclo-oxygénase 2 et du taux de prostaglandines dans les cardiomyocytes assurant toutes les deux un rôle de cyto-protection (Adderley and Fitzgerald 1999).

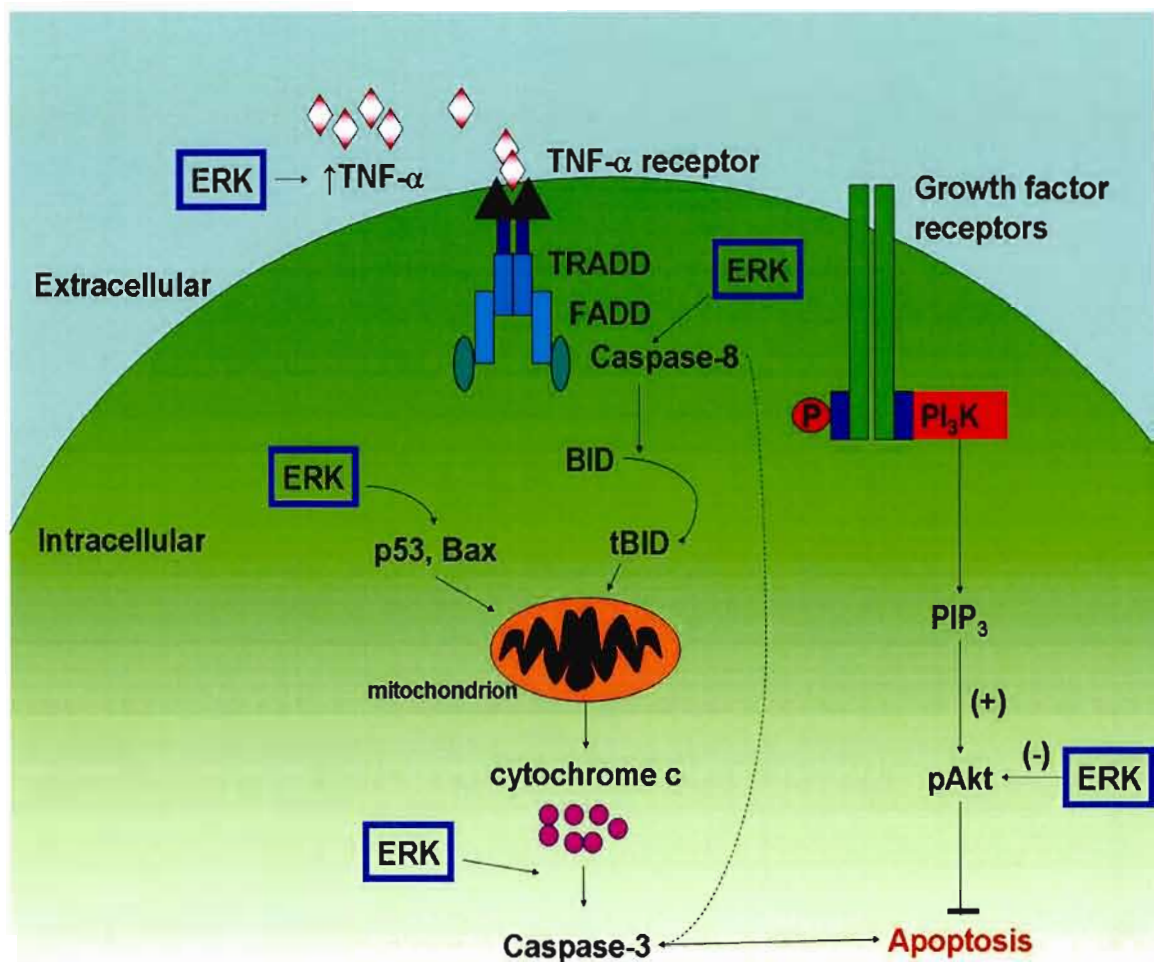


Figure 3.2 : Schéma général de l'implication d'ERK dans l'apoptose. Une variété de facteurs, y compris les cytokines, les hormones, les facteurs osmotiques, les chocs thermiques ainsi que bien d'autres stress activent les membres de la famille d'ERK. En réponse à des stimuli pro-apoptotiques ERK pourrait interagir avec p53 et Bax résultant en l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Dans certains cas de stress, ERK inhibe la phosphorylation d'AKT, ce qui favorise la voie de mort cellulaire par apoptose. Figure adaptée de Zhuang et Schnellmann; 2006.

A part ERK1 et 2, d'autres kinases de la famille des ERks ont été identifiées et caractérisées. Ainsi, la famille des ERK comprends six autres membres classées selon leurs ordres de découvertes de 3 à 6. Ces protéines kinases se distinguent d'ERK1 et 2 par leurs tailles, leurs substrats et par conséquent leurs fonctions qui restent encore mal définies bien qu'elle présente une structure très similaire à celle d'ERK1 (Peng, Angelastro et al. 1996).

3.3.3 ERK3

La découverte d'ERK3 est survenue après la description d'ERK1 et ERK2 (Boulton, Nye et al. 1991), nonobstant l'infime attention accordée à cette troisième kinase de la famille des ERks. ERK3 est une protéine de 63kDa comportant 543 acides aminés (Boulton, Nye et al. 1991). Sa séquence est à 50 % similaire avec celle d'ERK1, alors que son domaine V présente 83 % de similitudes avec celui d'ERK1. Pendant plusieurs années, les fonctions d'ERK3 sont restées méconnues et aucun homologue n'a été identifié chez les organismes inférieurs comme la levure ou *C. elegans* (Robinson, Xu Be et al. 2002). Cependant, comme ERK1 et ERK2, ERK3 est profusément exprimée chez les mammifères (Meloche, Beatty et al. 1996; Zhu, Yu et al. 1999). Son expression a été liée au développement embryonnaire. Son lieu d'activité est principalement le cytoplasme, bien que certaines études aient pu démontrer sa translocation nucléaire sans pour autant identifier ses substrats (Cheng, Boulton et al. 1996). Des essais *in vitro* ont identifié la microtubule-associated protein-2, c-Jun, Tal1, MyoD, ou Elk-1 comme substrats de cette MAPK mais le rôle exact ainsi que les mécanismes d'induction ou d'atténuation de son activité sont encore à définir.

3.3.4 ERK4

La découverte d'ERK4 a été faite chez des cellules neuronales PC12 stimulées avec le facteur NGF (Peng, Angelastro et al. 1996; Perander, Aberg et al. 2008).

C'est une protéine de 45 kDa, qui se distingue d'ERK1 par sa taille légèrement plus grande. Comme pour ERK3, les mécanismes d'activation ou de régulation restent encore mal définis bien qu'elle présente une structure très similaire à celle d'ERK1 (Peng, Angelastro et al. 1996).

3.3.5 ERK5

Deux rapports indépendants ont décrit la séquence d'une protéine kinase reliée aux ERKs, qui a été nommée ERK5, en accord avec l'ordre de découverte des ERKs. Certains l'ont même appelée grande MAP kinase (BMK) en raison de sa taille qui est la plus grande par rapport aux autres kinases appartenant à la même famille (MacCorkle and Tan 2005; Wang 2007). Trois homologues (a, h et g) de cette kinase ont été identifiées avec 98 % d'homologie. Les différences résident au niveau de leurs séquences aminoterminales (Lee, Ulevitch et al. 1995).

Il s'agit d'une protéine de 98kDa, comportant 816 acides aminés. Elle se distingue d'ERK1/2 par sa longue queue carboxyterminale avec environ 67 % de similitudes, qui se prolonge au site catalytique de la kinase. Cependant, la phosphorylation de cette kinase n'est pas effectuée par MEK1 ou MEK2 mais plutôt par MEK5 (Zhou, Bao et al. 1995). Comme ERK1/2, ERK5 a une gamme de substrats très diversifiée, incluant les facteurs de transcription c-Myc, NF- κ B, Sap1a, c-Fos et Fra-1 et de nombreux membres de la famille MEF2 (Kato, Kravchenko et al. 1997; English, Pearson et al. 1998; Chiariello, Marinissen et al. 2000; Kato, Chao et al. 2000). D'autres protéines comme les kinases induites par le sérum ou les Glucocorticoïdes (SGK) ont aussi été décrites comme des substrats d'ERK5 (Hayashi, Tapping et al. 2001; Terasawa, Okazaki et al. 2003).

ERK5 a été d'abord décrite comme étant exprimée abondamment dans tous les tissus cellulaires, à l'exception des cellules hépatiques où le niveau de son ARN_m est très

faible (Lee, Ulevitch et al. 1995). Peu après son clonage, son rôle comme protéine sensible à toute variation du potentiel oxydant des cellules a été prouvé en exposant des cellules musculaires au peroxyde d'hydrogène. Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules neuronales PC12 durant un stress oxydatif ou suite à l'ischémie cardiaque (Takeishi, Martin et al. 1991). D'autres travaux ont montré que le stress oxydatif n'est pas le seul stimulus d'ERK5 puisque la ligature de l'artère coronaire chez le rat est un activateur puissant de cette kinase (Yan, Takahashi et al. 1999). De même, ERK5 peut être activée en réponse à des facteurs de croissance. L'identification de ces stimuli a permis de mieux comprendre son mode d'action ainsi que son spectre d'interaction avec les autres kinases. Par exemple, l'expression constitutive du mutant MEK5 a été corrélée à l'expression des facteurs de transcription de la famille MEF2 en plus de la translocation d'ERK5 dans le noyau (Kato, Kravchenko et al. 1997).

Comme pour ERK1/2, plusieurs protéines kinases au niveau de MEKK peuvent être impliquées dans l'activation d'ERK5. Les protéines kinases MEKK2 et MEKK3 sont des protéines associées à MEK5, localisées près de la membrane cytoplasmique et elles assurent le rôle de médiateur ou de transmetteur des signaux extracellulaires (Sun, Kesavan et al. 2001; Nakamura and Johnson 2003). MEKK2, par exemple, est en mesure d'activer ERK5 en réponse au TNF α (Chayama, Papst et al. 2001) ou au facteur de croissance des fibroblastes (Kesavan, Lobel-Rice et al. 2004). D'autres études ont suggéré que la voie MEK5/ERK5 joue un rôle dans la transduction des signaux cellulaires impliquant la protéine Ras de façon dépendante de Raf (English, Pearson et al. 1999). Par ailleurs, la kinase ERK5 a été décrite comme facteur anti-apoptotique en phosphorylant et inactivant Bad (Pi, Yan et al. 2004). Ceci démontre également qu'ERK5 a des substrats en dehors du noyau. Dans le même contexte, la létalité embryonnaire des souriceaux déficients en ERK5 pourrait confirmer l'implication de ERK5 dans les mécanismes de survie cellulaire, dans le maintien de l'intégrité vasculaire ou du volume des tissus cardiaques (English, Pearson et al. 1999;

Nicol, Frey et al. 2001; Hayashi and Lee 2004).

Indépendamment de ses effets cardiovasculaires et myogéniques, ERK5 a été impliquée dans la régulation du cycle cellulaire via l'activation de l'expression de la cycline D1 contrôlant la prolifération (Mulloy, Salinas et al. 2003). De même, la surexpression d'ERK5 joue un rôle dans la prolifération des cellules épithéliales induite par les facteurs de croissance (Kato, Kravchenko et al. 1997; Kato, Tapping et al. 1998). En outre, la surexpression de MEK5, observée dans les biopsies prélevées de patients souffrant du cancer de prostate, est venue confirmer qu'ERK5 joue un rôle important dans la prolifération, la motilité, et l'invasion via l'induction de l'expression de la metalloprotéinase 9 (Mehta, Jenkins et al. 2003).

3.3.6 ERK6

Trois études indépendantes ont décrit pour la première fois une MAP kinase de 46kDa impliquée dans la différenciation des cellules myoblastes murins C2C12 (Lechner, Zahalka et al. 1996; Li, Jiang et al. 1996; Kumar, McDonnell et al. 1997). On l'a définie comme une MAP kinase activée par les stress extracellulaires et fortement exprimée dans le cytosquelette des cellules musculaires (Mertens, Craxton et al. 1996), ou comme membre de la famille des p38 MAPKs (325 Li et al., 1996). Par la suite, les noms attribués à cette kinase sont respectivement ERK6, SAPK3 et p38-g. Dans ce travail, on utilisera uniquement le nom ERK6.

Il s'agit d'une protéine de 367 acides aminés et d'une taille de 40,3 kDa (Pi, Yan et al. 2004). Elle possède 41 % d'homologie avec ERK1, 39 % avec ERK2 et 33 % avec ERK3 (Lechner, Zahalka et al. 1996). Elle présente également une forte homologie avec la p38 MAP kinase (60 %) qui s'étend jusqu'au site actif de la kinase, expliquant la préférence de certains chercheurs à utiliser SAPK-3 ou p38-g comme nom au lieu d'ERK6 (Li, Jiang et al. 1996; Mertens, Craxton et al. 1996). De plus, les premiers essais d'activation d'ERK6 utilisaient des stimuli des p38. MKK6, par

exemple, connu comme activateur de la famille de p38 MAPK, est également capable d'activer ERK6 (Cuenda, Cohen et al. 1997). Le membre des protéines G, Rho, a été également décrit comme une protéine agissant en amont d'ERK6 (Marinissen, Chiariello et al. 2001). Cependant, plusieurs différences entre la famille des p38 MAPKs et ERK6 ont été retracées, comme l'insensibilité d'ERK6 à l'inhibiteur SB203580 des p38 (Cuenda, Cohen et al. 1997; Goedert, Cuenda et al. 1997; Marinissen, Chiariello et al. 2001). Par conséquent, ERK6 reste un membre distinct de la famille p38, mais possède également des propriétés spécifiques concernant la préférence du substrat. Ceci sera expliqué plus loin.

ERK6 a des substrats typiques de MAPKs tels les facteurs de transcription ATF2, A1-syntrophine, SAP90/PSD95Elk-1 et SAP1. Cependant, elle ne peut pas phosphoryler MAPKAPK2 ou MAPKAPK3, qui sont des substrats connus de la famille p38 (Cuenda, Cohen et al. 1997). Cette spécificité de substrat a été expliquée par l'affinité entre la courte séquence terminale d'ERK6 et celle du domaine PSD-95/Discs-large/ZO-1 (PDZ) des substrats (Hasegawa, Cuenda et al. 1999).

Mais avant de détailler l'activité d'ERK6, l'identification des stimuli extracellulaires est indispensable. En effet la surexpression de cette kinase a été décrite comme conséquence d'une exposition des cellules aux rayons UV, au choc osmotique ou aux cytokines proinflammatoires (TNF α , interleukine 1, etc.; (Cuenda, Cohen et al. 1997)). Cependant, puisqu'ERK6 partage les mêmes intermédiaires agissant en amont de cette kinase, comme MKK6 avec la famille des p38 MAP, celle-ci sera activée en parallèle (Cuenda, Cohen et al. 1997). D'autres études ont, par contre, montré que l'étoposide, bien qu'il active les p38 MAPKs, est incapable d'activer ERK6 (Pillaire, Nebreda et al. 2000) alors que la sérine/thréonine kinase C ou la petite protéine G Rit active ERK6 mais pas la p38 α (Sakabe, Teramoto et al. 2002). Ceci a été expliqué par le fait qu'ERK6 exige un niveau d'activité de MKK6 plus élevé que celui exigé par les p38 kinases (Alonso, Ambrosino et al. 2000). D'autres suggèrent que c'est la localisation intracellulaire qui contrôle l'activation de

ces deux familles de MAP kinases (Boppart, Asp et al. 2000).

En ce qui concerne son effet biologique, il a été démontré qu'ERK6 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire (Wang, McGowan et al. 2000) ainsi que dans la maturation de la protéine Rit (Sakabe, Teramoto et al. 2002) mais les protéines cibles doivent encore être identifiées.

3.3.7 ERK7/8

La découverte d'ERK7 est survenue en 1999 suite à l'utilisation d'une séquence d'une kinase fortement conservée chez les MAPKs (Abe, Kuo et al. 1999). Récemment, l'exploration du génome humain a permis d'identifier un homologue de ERK7 : c'est la MAP kinase ERK8 (Abe, Saelzler et al. 2002). ERK7 est une protéine de 61kDa contenant 546 acides aminés (Abe, Kuo et al. 1999). Cette grande taille est due à une prolongation de la portion carboxyterminale par une séquence peptidique comprenant 195 acides aminés qui suit son domaine kinase. L'ordre des acides aminés d'ERK7 est approximativement 40 % homologue à celui de ERK1 et ERK2 (Abe, Kuo et al. 1999). Son site de phosphorylation contient un motif T-E-Y, mais les événements menant à son activation demeurent encore méconnus. ERK8, quant à elle, est une kinase de 60kDa comptant 544 acides aminés. Elle présente 68 % d'homologie avec ERK7. Cependant, bien que plusieurs études essaient de les rapprocher, ERK7 et ERK8 sont deux membres distincts de la famille des ERKs, et qui ont des substrats différents. En effet, ERK8 phosphoryle c-Jun, c-Myc, c-Maximum, Elk1, Ets-1 et la paxilline qui ne sont pas des substrats de ERK7 (Bogoyevitch and Court 2004).

CHAPITRE IV : LA PROTÉINE P53

La protéine p53, protéine suppresseur de tumeur, est une phosphoprotéine de 393 acides aminés de poids moléculaire de 53 kDa. Elle est omniprésente et a une demi-vie relativement courte (une vingtaine de minutes en moyenne). De ce fait, dans les conditions physiologiques normales cette protéine existe en très faible quantité. Elle est même indétectable dans certains tissus. En revanche, suite à toutes situations compromettant la survie cellulaire (lésions génotoxiques, hypoxie, activation d'oncogènes cellulaires ou viraux, anomalies de la concentration en ribonucléotides, etc.), le gène p53, situé sur le bras court du chromosome 17 position p13.1, s'exprime-t-il d'une manière importante. L'accumulation de p53 engage ainsi les cellules dans les programmes d'arrêt du cycle cellulaire, de réparation de l'ADN, de différenciation, d'arrêt d'angiogenèse et d'invasion, ou de mort cellulaire par apoptose (Yang, Smith et al. 1999).

De point de vue structurel, p53 est constituée de 3 sous-unités :

1. Le domaine aminoterminal qui est le site de l'activité transactivatrice (TA).
2. Le domaine central qui correspond à la région de fixation spécifique à l'ADN (DBD).
3. Le domaine carboxyterminal qui est la région régulatrice de l'activité de p53. Elle contient le signal de localisation nucléaire (NLS), le domaine d'oligomérisation et la région de fixation non spécifique à l'ADN.

Les domaines amino et carboxyterminaux contiennent plusieurs sites d'acétylation et de phosphorylation par diverses protéines kinases, comme les caséines kinases I et II (CKI, CKII), la protéine kinase dépendante de l'ADN double brin (DNA-PK), la protéine kinase C (PKC), les protéines kinases ATM (pour *Ataxia-telangiectasia*-

mutated) et ATR (pour *Ataxia-Telangiectasia Related*) (Luk, Siu et al. 2005) ou les protéines MAP kinases ERK1/2 et p38 (She et al., 2000). Les réactions de phosphorylation et d'acétylation dans la zone carboxyterminale rendent la fixation du domaine central possible sur la séquence d'ADN spécifiquement reconnue par la p53. La phosphorylation de la séquence aminoterminal contrôle l'activité transactivatrice et/ou l'association à d'autres protéines telles que le facteur de transcription TFIID et la protéine TBP (pour Tata Binding Protein-TAFs ; (Somasundaram and El-Deiry 1997)).

Deux protéines présentant de fortes homologies de structure avec la p53 ont été découvertes. Il s'agit de la p63, encore appelée KET, p51, p40, ou p73L et de la p73. La p63 et la p73 sont constituées d'un domaine de fixation à l'ADN (DBD), entouré d'un domaine de transactivation (TD) du côté aminoterminal et d'une longue région carboxyterminale, incluant un domaine d'oligomérisation. La p63 et la p73 existent sous de multiples isoformes (p63 α , p63 β , p63 γ , p73 α et p73 ξ). Leur expression est le résultat d'épissages alternatifs dans la région 3' traduite de l'ARN pré-messager (Moll and Slade 2004). Il existe aussi une forme de p63 tronquée dans son domaine TA (Δ n p63 ; (Moll and Slade 2004)). La région carboxyterminale de la p63 α et de la p73 α contient un domaine SAM (pour : Motif Alpha Sterile), que l'on retrouve dans de nombreuses protéines impliquées dans le développement ou la différenciation (Schultz, Ponting et al. 1997). Certaines isoformes de p63 et de p73 sont capables de transactiver des gènes comportant des séquences régulatrices répondant à p53, ou d'induire l'apoptose. Malgré certaines propriétés similaires, les fonctions de la p63 et de la p73 semblent différentes de celles de la p53, ceci en plus d'une expression restreinte à certains tissus (Moll and Slade 2004).

Du point de vue fonctionnel, p53 est un facteur de transcription qui, une fois activé (en réponse à différents types d'agressions cellulaires), orchestre l'expression de nombreux gènes cibles. L'ubiquitine ligase Mdm2 est un des gènes cibles clés de p53 (Levine 1997; Coates 2007). Dans les conditions physiologiques normales, ce

gène code pour une protéine à multiples fonctions, capable d'antagoniser l'activité de p53 en masquant son domaine transactivateur. Par conséquent, p53 sera transportée vers le cytoplasme avant d'être dégradée par le protéasome (Calabro, Mansueto et al. 2002). Suite au stress, des modifications post-traductionnelles, telles des phosphorylations, déphosphorylations, acétylations, délétions du domaine carboxyterminal ou addition d'un peptide à l'extrémité carboxyterminale permettent d'activer la p53 via des interactions avec plusieurs protéines comme Pin1. Ces modifications vont également favoriser la stabilité de cette protéine et inhiber son interaction avec Mdm2, d'où l'accumulation de p53. La protéine p53 active est également un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes, par exemple p21, MDM2, PIG3, GADD45, 14-3-3, Bax, Bcl-2, DR5, NOXA, PUMA dont les produits des gènes interviennent à différents stades du cycle cellulaire et/ou des voies apoptotiques (Figure 4.1) (Calabro, Mansueto et al. 2002; Fields, Hanisch et al. 2007). Ainsi, p53 peut-elle jouer deux principales fonctions en conduisant soit à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire dont elle régule la phase G1/S, ou à l'apoptose (Levine 1997; Wang and El-Deiry 2008) (Figure 4.2).

4.1 Arrêt du cycle cellulaire

Pour éviter que les dommages subis par l'ADN n'entraînent des erreurs ou des mutations lors de la réplication, p53 intervient comme "gardien du génome" en bloquant l'initiation de la phase S. En effet, p53 active se fixe au gène WAF1/Cip1, (pour Wild Type p53-activated fragment et cdk2 inhibiting protein) pour induire la synthèse de p21. La protéine p21 peut alors se lier directement à CDK2 et inhiber la formation du complexe CDK2/cycline E impliquée dans la transition G1/S. De même, plusieurs produits de gènes dont la transcription est activée par p53 peuvent inhiber le complexe CDK2/cycline B, indispensable pour la progression de la phase G2. La protéine 14-3-3σ par exemple, qui séquestre CDK2 dans le cytoplasme, est l'une des protéines induites par p53. Enfin, p53 induit l'expression de la protéine GADD 45

dont le rôle est de dissocier le complexe CDK2/cycline B (Aylon and Oren 2007; Mallette and Ferbeyre 2007).

4.2 Contribution de la p53 à l'apoptose

Suite à des stress sévères comme l'irradiation ou l'hypoxie, p53 engage les cellules dans le processus apoptotique via l'induction de certains gènes avec une spécificité avérée. Parmi ces gènes, on cite *killer/dr5*, *fas/apo-1*, *pig3*, *puma* et *bax*. Ce choix d'induire spécifiquement les gènes d'apoptose, et non ceux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, est patronné par des cofacteurs protéiques. Une première possibilité est une interaction fonctionnelle d'un cofacteur avec p53 ou avec une protéine associée à son activation. JMY coopère, par exemple, avec p300 pour accroître la capacité de p53 à induire l'expression du gène *Bax*, sans pour autant induire le gène *cdkn1a* qui code pour p21waf1, régulateur du cycle cellulaire (Ohnishi 2005; Bose and Ghosh 2007). Ainsi JMY favorise l'apoptose et non l'arrêt du cycle cellulaire. Une seconde possibilité est l'interaction spécifique d'une protéine de la famille ASPP (pour apoptosis stimulating protein of p53) avec la p53 (Ohnishi 2005; Zhang, Wang et al. 2005). Une telle interaction augmentera significativement la capacité de p53 à se fixer sur le promoteur du gène *bax* (Porebska, Wyrodek et al. 2006). Enfin, rappelons que le facteur de transcription NF- κ B ainsi que les protéines MAP kinases peuvent influencer positivement ou négativement la réponse apoptotique induite par p53 (Ide 2006).

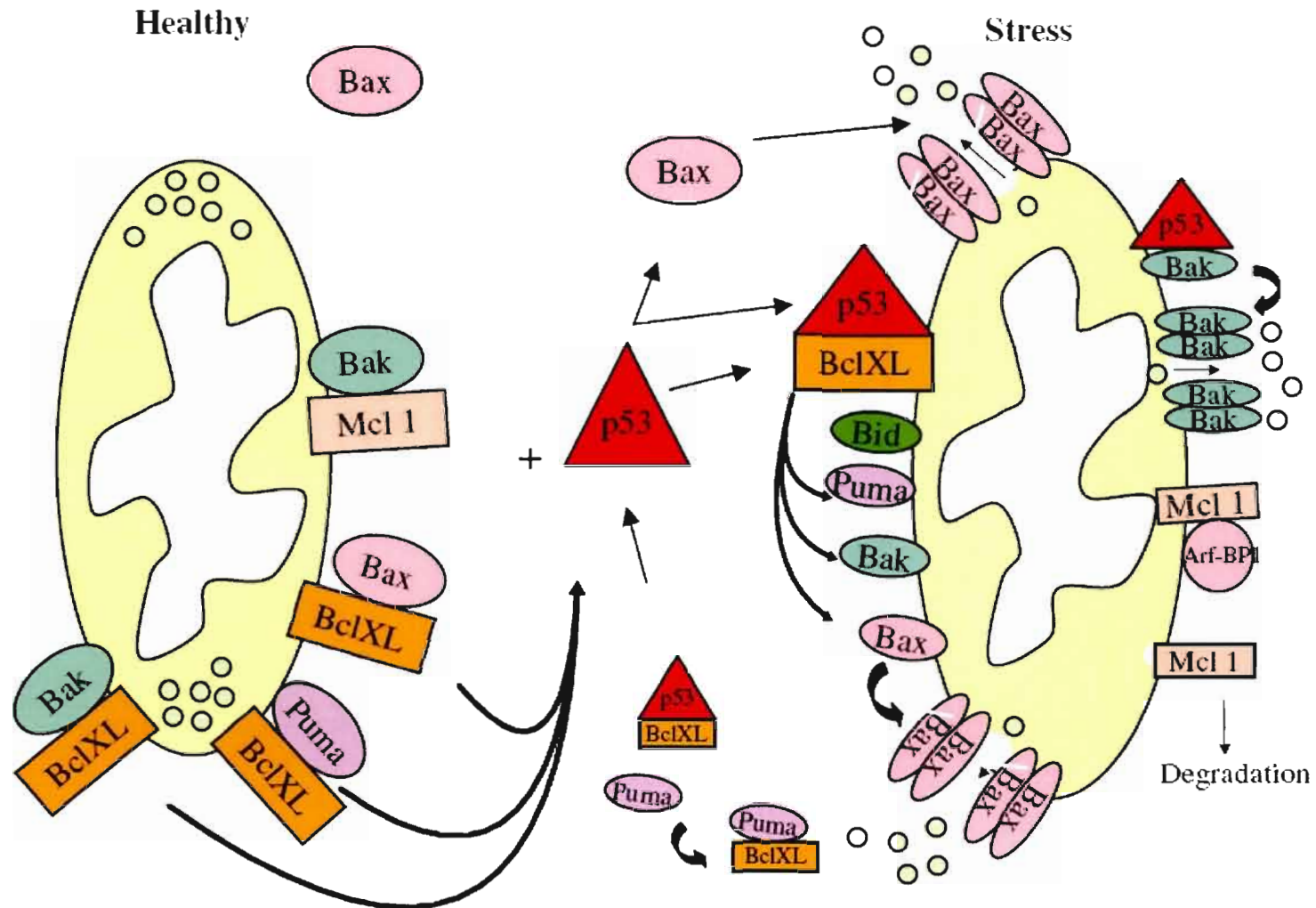


Figure 4.1 : Représentation schématique du rôle de la protéine p53 dans la régulation des fonctions des protéines Bcl-2. La protéine p53 active est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes, entre autres *Bax*, *Bcl-2*, *DR5*, *NOXA*, *PUMA* dont les produits de interviennent au niveau de la voie mitochondriale de l'apoptose. p53 peut également se lier directement avec Bcl-XL et inhiber son action favorisant ainsi l'action des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Figure adaptée de Moll et al., 2006.

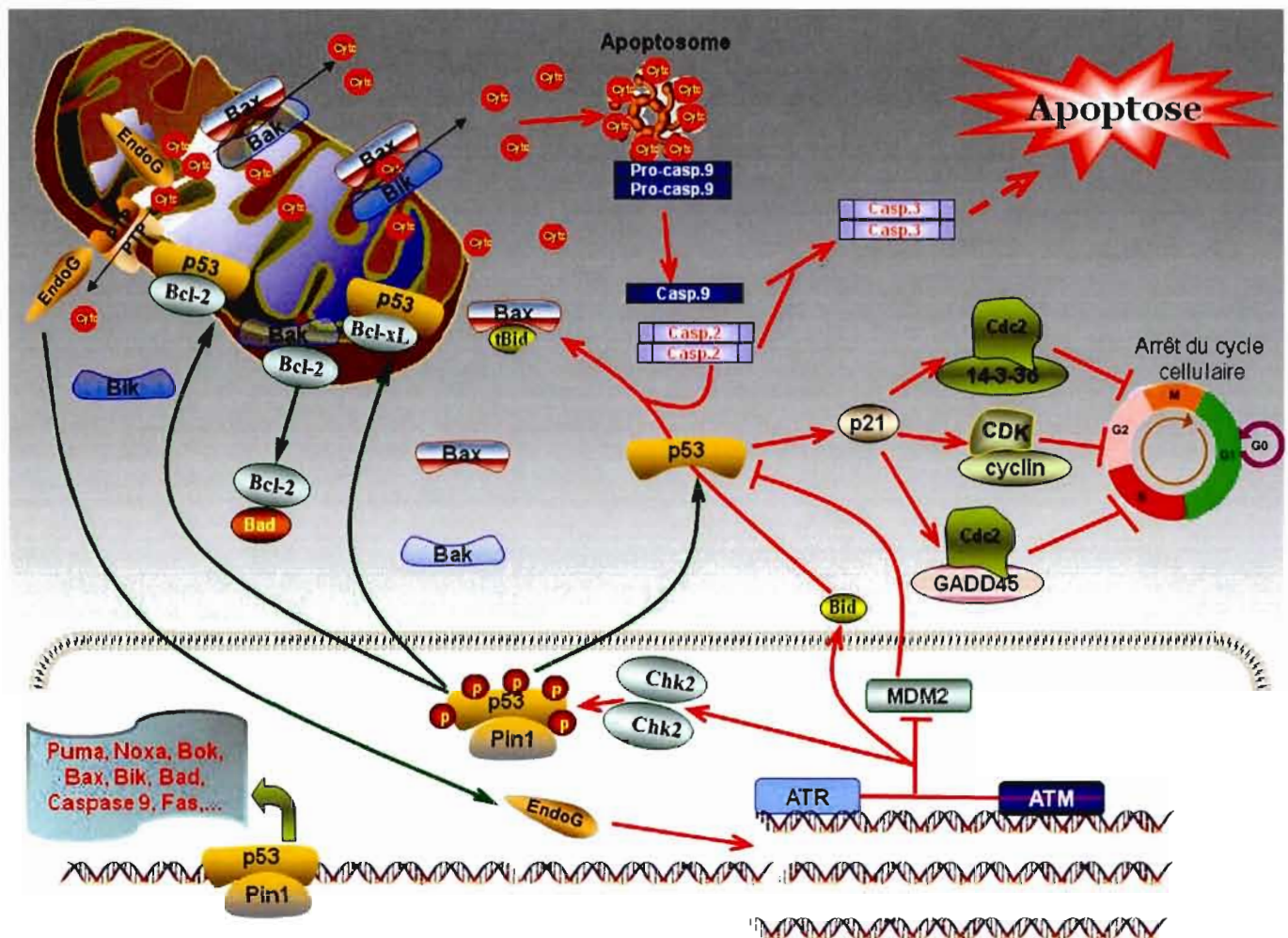


Figure 4.2 : Représentation schématique de l'hétérogénéité des voies de signalisation utilisées par la protéine p53. Suite aux divers stimuli tels que les lésions de l'ADN, l'hypoxie, les infections virales et l'activation d'oncogènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la différenciation, la protéine p53 est activée et stabilisée par phosphorylation et acétylation. Ceci la transforme en un puissant facteur de transcription spécifique d'une séquence de l'ADN. Le vaste spectre des effets biologiques de la p53 s'explique en partie par sa capacité d'activer l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels *p21* (*WAF-1*), *GADD45*, *14-3-3sigma*, *bax*, *BRG2*, *PIG3*, *IGFBP3*, etc. Figure adaptée de Soussi, 2000. <http://visiscience.com/samples/signaling/>

CHAPITRE V : LES PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE

Les protéines de choc thermique ou protéines de stress (traduction de «heat shock proteins» : HSPs) forment une famille de protéines hautement conservées au cours de l'évolution. Elles ont été découvertes en deux étapes. La première, en 1962, grâce à un chercheur italien nommé Ferrico Ritossa qui a décrit l'activation des gènes localisés sur des chromosomes bien spécifiques dits « Pulmeux » chez des cellules de glandes salivaires de drosophiles à une température légèrement supérieure à la normale. Puis, en 1974, Tissiere et Mitchell ont remarqué qu'une activation des chromosomes pulmeux aurait comme conséquence la synthèse de ces protéines (Tissieres, Mitchell et al. 1974). À partir de 1974, la nomenclature « protéines de choc thermique » fut établie. Dès lors, les chercheurs ont commencé à étudier la structure, la conformation, les propriétés catalytiques et les rôles de ces protéines.

Les HSPs jouent un rôle essentiel dans la vie cellulaire mais également en cas de stress d'origine chimique, physique ou métabolique (Vayssier and Polla 1998; David and Grongnet 2001). Elles sont présentes dans le cytosol, dans les mitochondries, dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le noyau (Tableau 5.1). En général, les HSPs possèdent une demi-vie relativement longue, d'environ 48 heures. Elles peuvent être séparées en 3 groupes, les HSPs de haut poids moléculaire (60 à 110 kDa), les « glucose-regulated-proteins » (GRP, 34 à 174 kDa) induites lors d'une déprivation en glucose et les HSPs de petit poids moléculaire (20 kDa, similaire à l' α -crystalline).

Tableau 5.1: Liste des principales protéines du choc thermique

HSP	Co-chaperonnes/isoforme	Expression	Localisation
HSP27	Différent isoformes	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau
HSP60	HSP60/HSP10 cytosol	Constitutive/Inductible	Cytoplasme
	HSP60/HSP10-mitochondrie	Constitutive	Mitochondrie
HSP70	HSP70	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau
	HSP70.1	Constitutive/Inductible	Cytoplasme
	HSP70.2	Constitutive	Cytoplasme
	HSP70.3	Constitutive	Cytoplasme
	HSP75	Constitutive/Inductible	Mitochondrie
	GRP75	Constitutive	Cytoplasme/ER
	GRP78/Bip	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau/ER
	HSP105	Constitutive	Cytoplasme/Noyau
HSP90	HSP90- α	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau
	HSP90- β	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau
	HSP90- σ	Constitutive/Inductible	Cytoplasme/Noyau
	HSP75/TRAP1	Constitutive/Inductible	Mitochondrie
HSP110	Différent isoformes	Constitutive/Inductible	Cytoplasme

5.1 La famille des HSPs 70

Parmi toutes les familles des HSPs, la famille des Hsp70 est la plus conservée. Certains membres sont spécifiquement associés à des compartiments intracellulaires comme le cytosol (HSP70/HSC70), ou à des organelles tels que la mitochondrie (HSP75) ou le réticulum endoplasmique (GRP78) (Jacquier-Sarlin, Fuller et al. 1994). Cependant, cette localisation est sujette à des modifications lors d'une exposition des cellules à un stress (Ellis, Killender et al. 2000).

D'un point de vue structural, la forme inductible de la HSP70 aussi bien que sa forme constitutive HSC70, sont formées par trois domaines de taille différente :

1. Le domaine carboxyterminal de 10 kDa.
2. Un deuxième domaine de 18 kDa.
3. Un troisième domaine aminoterminal de 44 kDa.

Il s'est avéré, de plus qu'en raison de leur structure et leur localisation intracellulaire bien particulière, chaque membre de la famille des HSPs 70 ait une activité bien spécifique en plus de leur fonction commune de chaperone (Tanguay, Wu et al. 1993).

Un nombre important d'études rapporte l'action anti-apoptotique de la protéine HSP70 durant la transduction du signal apoptotique (Mosser, Caron et al. 2000; Park, Kim et al. 2000; Beere and Green 2001). Ainsi, une inhibition ou une diminution du taux de synthèse de cette protéine facilite-t-elle l'entrée des cellules cancéreuses en apoptose (Ravagnan, Gurbuxani et al. 2001). Dans le même ordre d'idées, plusieurs études ont montré qu'une augmentation de l'expression de la HSP70 prévient l'activation de différentes caspases et protéases, intervenant lors des processus de dégradation plus tardifs du mécanisme de mort cellulaire programmée (pour revue; Calderwood and Ciocca, 2008). Une telle inhibition peut survenir aussi bien en amont qu'en aval de la perturbation des fonctions mitochondriales et la libération des facteurs proapoptotiques. De plus, l'activité chaperone de cette famille de protéines comprend la lutte contre les radicaux libres, le monoxyde d'azote et les cytokines résultant d'un stress oxydatif, de l'activation des macrophages, dans la conversion de la protéine prion de sa forme normale à sa forme infectieuse, dans la lutte contre les mycobactéries, aussi bien que dans les maladies auto-immunes (pour revue; Graham 2001).

La famille des HSP70 assure également un rôle de thermoprotection en agissant comme inhibiteur de la protéine kinase SAPK/JNK, responsable de la phosphorylation aminoterminal de c-Jun et par conséquent elle prévient l'entré de la

cellule dans un processus apoptotique médiée par la voie de signalisation impliquant la JNK (Mosser, Caron et al. 1997).

5.2 La famille des HSPs 27

À cause de son faible poids moléculaire, la famille des HSPs 27 appartient au groupe des petites protéines de stress comptant jusqu'à 20 HSPs différentes (Arrigo et Landry, 1994). Au sein de ce groupe, connu pour être le moins conservée et le plus hétérogène dans l'évolution, la famille des HSPs 27 comprend seulement 3 membres : HSP- β 1, β 2 et β 3. Leur distribution varie selon les organes et les espèces. Chez les rongeurs, la HSP25 (homologue de la HSP27 chez l'humain) est majoritairement localisée au niveau du cristallin, des cellules de la vessie, de l'estomac, du colon, des poumons et du cœur (Arrigo, Simon et al. 2007; Arya, Mallik et al. 2007). Chez l'humain, HSP27 se localise en majorité dans les tissus épithéliaux, notamment dans les muscles striés et dans les cellules de l'endomètre utérin, l'épithélium du tractus génital féminin, les cellules musculaires lisses, striées et certaines cellules sanguines comme les leucocytes et les plaquettes (Ciocca, Oesterreich et al. 1993).

En ce qui concerne leurs implications cliniques, une surexpression des HSPs 27 a été détectée dans plusieurs types de cancers tels que les cancers de l'estomac, de l'utérus et du sein. D'autre part, ces mêmes protéines interviennent dans les mécanismes de la résistance à la chimiothérapie et notamment aux médicaments anti-cancéreux comme la doxorubicine (Oesterreich, Weng et al. 1993; Oesterreich, Hickey et al. 1996). Elles interviennent, de plus, dans les infections virales comme celles causées par les adénovirus. Dans ce cas, l'infection inhibe l'induction de la HSP27 même si on augmente la température, supprimant par la même occasion son rôle protecteur sur l'apoptose induite par des médicaments anti-cancéreux comme la doxorubicine, la colchicine, le 5-fluorouracile, le cisplatine, l'actinomycine D et le methotrexate (Ciocca, Fuqua et al. 1992; Garrido, Ottavi et al. 1997; Turakhia, Venkatakrishnan et al. 2007; Venkatakrishnan, Dunsmore et al. 2008). Mehlen et ses

collaborateurs (1997) ont confirmé l'effet protecteur de la HSP27 suite à la découverte d'une surexpression de cette protéine chez des cellules exposées au stress oxydatif ou lors de la différenciation cellulaire (Mehlen, Hickey et al. 1997). HSP27 s'associe au cytosquelette, plus particulièrement aux filaments intermédiaires de kératine et les microtubules. Elle participe ainsi à leur assemblage et à leur polymérisation. Elle prévient également l'agrégation des protéines dénaturées et favorise leur retour à une conformation fonctionnelle. Cependant, pour assurer la plupart de ses fonctions, la phosphorylation de la HSP 27 est une étape primordiale dans son activation. La phosphorylation de HSP27 survient également suite à l'exposition aux différents stress comme le choc thermique, le stress oxydatif mais aussi les agents chimiothérapeutiques (Bjorkdahl, Sjogren et al. 2007; Casado, Zuazua-Villar et al. 2007) et elle précède sa redistribution essentiellement nucléaire et au niveau de la région périnucléaire.

Suite à un choc thermique, l'expression de la HSP27 pourrait augmenter pour induire un état de résistance connu sous le nom de thermotolérance (Figure 5.1). La phosphorylation, la relocalisation nucléaire et la formation d'oligomères pouvant atteindre 2000 kDa sont des phénomènes caractéristiques de cet état de thermotolérance et cela permet de conférer aux cellules un effet protecteur contre l'induction de l'apoptose induite non seulement par le choc thermique mais aussi par une pléthore de stress incluant le stress induit par des métaux lourds et le stress oxydatif (Arrigo 2007; Schmitt, Gehrmann et al. 2007).

5.3 La famille des HSPs 90

La HSP90 présente environ 40 % d'homologie entre les eucaryotes et les procaryotes. C'est la chaperonne la plus abondante de la cellule eucaryote. La famille des HSP90 est issue de deux gènes dont les produits sont dénommés Hsp90 α et Hsp90 β ou encore connus sous le nom de Hsp86 et Hsp84. Elles sont localisées au niveau du cytosol ainsi qu'en faible quantité dans le noyau de la cellule sous la forme

d'homo-dimères (Pearl and Prodromou 2000). Comme toutes les autres chaperonnes, HSP90 est hydrophobe : cependant, cette hydrophobicité augmente après un choc thermique (Howard, Holley et al. 1990). De plus, cette protéine possède deux domaines chargés négativement, lui conférant en plus de son hydrophobicité la propriété de reconnaître d'autres séquences peptidiques hydrophobes (Csermely, Schnaider et al. 1998). Ceci suggère la possibilité de se lier aux différentes protéines structurales comme l'actine et la tubuline (Sanchez, Redmond et al. 1988), assurant ainsi la stabilisation des microtubules (Garnier, Lafitte et al. 2001). La HSP90 peut s'associer avec d'autres protéines de stress telles que la HSP70 pour jouer son rôle biologique, mais généralement, elle s'associe avec une autre molécule de HSP90 pour former des dimères, voire même des oligomères.

Généralement, les membres de la famille des HSP90 contribuent à de nombreux processus cellulaires dont la transduction de signal initiés par divers stimuli au niveau de la membrane ainsi que le repliement et la dégradation des protéines. Cette classe de chaperonnes assure également le transport des peptides et de nombreuses autres molécules entre le cytoplasme et le noyau, ainsi que la protection contre les infections. En ce qui concerne les implications cliniques, il a été démontré que la HSP90 est impliquée dans la cardiomyopathie (Soti and Csermely 2006), dans l'ischémie (Drognitz, Michel et al. 2006) et dans différents types de cancers (Goetz, Toft et al. 2003).

5.4 L'hème oxygénase

L'hème oxygénase (HO) est une protéine de choc thermique jouant un rôle important dans la protection des tissus contre le stress oxydatif. Elle protège aussi les tissus intestinaux contre les réactions inflammatoires. Jusqu'à aujourd'hui, 3 formes d'hème oxygénase ont été identifiées : la forme inductible HO-1, la forme HO-2 et la forme HO-3 qui sont les deux formes constitutives (Otterbein, Soares et al. 2003). Ces deux dernières sont présentes dans le cerveau, la rate, le foie, les reins alors que

la forme inductible HO-1 est principalement retrouvée dans le foie et la rate. La forme qui nous intéresse dans ce projet est la HO1 ou HSP32. Son expression pourrait être induite suite aux dommages causés par le stress oxydatif, les rayons UV, l'hypoxie, l'épuisement du glutathion, l'hyperthermie, l'endotoxine, et, plus récemment, l'oxyde nitrique dans la plupart des tissus (Hill-Kapturczak, Jarmi et al. 2007; Katavetin, Tungsanga et al. 2007; Takahashi, Shimizu et al. 2007; Dulak, Deshane et al. 2008). Cependant le taux le plus élevé de cette forme inductible a été détecté dans la rate.

5.5 La famille des GRPs

Outre les HSPs classiques, des polypeptides, dont la synthèse augmentait lors d'un manque de glucose, sont considérés, au moins certains d'entre eux, comme des protéines chaperonnes et sont désignées par l'abréviation GRPs (pour stress-inducible glucose regulated proteins). Se sont des protéines ubiquitaires qui résident majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique et qui jouent un rôle potentiel dans la maturation, l'assemblage et la conformation des protéines (Calderwood, Mambula et al. 2007; Richter, Reinstein et al. 2007).

La chaperone GRP78, communément connue sous le nom de Bip, est le membre le plus documenté et caractérisé de cette famille. Elle est localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique attachée à la partie aminoterminal de PERK (pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 kinase) et à la protéine Ire1 (Inositol Requiring Enzyme 1), les maintenant ainsi sous forme inactive. Bip joue également un rôle potentiel dans la maturation des polypeptides et leur translocation efficace à travers le RE. Son induction survient suite à toute situation compromettant la survie cellulaire et conduisant au stress du RE (Gething 1999). Lors d'un stress du RE, la dissociation de Bip des protéines transmembranaires Ire1 et PERK permet l'oligomérisation de celles-ci et leur activation. L'activation de PERK, par autophosphorylation, cause la phosphorylation de eIF2 α et son inhibition, résultant

ainsi en l'inhibition de la traduction.

La GRP94, quant à elle, est localisée aussi dans le réticulum endoplasmique et elle se lie à différentes protéines (kinases, actine, calmoduline). Elle intervient dans le système de contrôle de qualité de la fonction du réticulum endoplasmique en se liant aux protéines mal assemblées ou incomplètement repliées (Suzuki, Lu et al. 2007; Kudo, Kanemoto et al. 2008). Elle est structurellement et fonctionnellement similaire à la HSP90 (Richter, Reinstein et al. 2007). La GRP94 se trouve également liée à la transferrine avec une affinité élevée au niveau de la surface cellulaire assurant ainsi, un rôle dans la présentation de l'antigène. Bien que plusieurs études rapportent son implication dans un stress du RE et dans l'apoptose induite par le stress du RE, les fonctions exactes ne sont pas encore complètement élucidées (Csermely, Schnaider et al. 1998).

CHAPITRE VI : RÔLE DU CHOC THERMIQUE ET DE L'HYPERTHERMIE DANS LA RÉGULATION DE LA CASCADE APOPTOTIQUE

L'hyperthermie est définie comme une élévation modérée de la température et elle désigne une situation de dérégulation de l'homéothermie. Elle est soit d'origine pathologique, résultant alors d'une réponse de l'organisme aux infections virales ou bactériennes, soit due à une exposition aux températures élevées. L'hyperthermie peut être létale ou non létale, en fonction du degré de la température. Au cours des deux dernières décennies, l'hyperthermie a été utilisée comme complément particulièrement efficace dans le cas d'une approche pluridisciplinaire du traitement anticancéreux ainsi que dans le traitement de certaines pathologies urogénitales chroniques. En Europe, l'hyperthermie est un standard pour le traitement des cancers du col utérin et de certains sarcomes. Son utilisation dans le traitement du cancer, bien méconnue du grand public, date de la haute antiquité égyptienne. En effet, le papyrus médical égyptien rapporte une tentative de traitement d'un cancer du sein à l'aide d'une "tige chauffée" (Ares 1974). De même, plusieurs médecins grecs, dont Hippocrate, proposeront de cautériser certaines tumeurs superficielles en utilisant du métal chauffé. En médecine contemporaine, l'hyperthermie est utilisée selon plusieurs modèles. On distingue ainsi l'hyperthermie globale, l'hyperthermie superficielle, l'hyperthermie profonde locorégionale, la perfusion hyperthermique interstitielle et la thermothérapie par hautes fréquences. Dans tous ces modèles, le potentiel thérapeutique est fondé sur la capacité d'induire des lésions aux cellules tumorales par l'application d'un choc thermique brusque et létal (Fiorentini and Szasz 2006; Kamisawa, Tu et al. 2006; Eveno, Dagois et al. 2008; Kawai, Futakuchi et al. 2008; Kikumori, Kobayashi et al. 2008).

6.1 Les effets du choc thermique sur les cellules

Il a été démontré que le choc thermique cause une perte de l'homéostasie cellulaire, accompagnée d'une dénaturation des protéines et de leur accumulation dans le RE (Parsell and Sauer 1989; Brostrom and Brostrom 1990; Konings, Hettinga et al. 1993). Les protéines sont la première cible du choc thermique, et l'altération de l'homéostasie cellulaire suite au choc thermique entraîne un certain nombre de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, l'acétylation, l'acylation, la phosphorylation, la farnéylation et l'ubiquitination (Bensaude, Bellier et al. 1996). De même, le choc thermique est connu pour générer l'arrêt de la prolifération cellulaire (Bensaude, Bellier et al. 1996) ainsi que la fragmentation d'ADN (Kuhl, Kunz et al. 2000; Lui and Kong 2007). Plusieurs études ont démontré, grâce à l'hyperthermie (42 à 44°C), la possibilité d'induire l'apoptose tout en causant la fragmentation d'ADN, le clivage de l'ADP-ribose polymérase et la condensation de la chromatine dans des lymphocytes T (Mosser and Martin 1992; Boreham, Dolling et al. 1997), des cellules HeLa (Bettaieb and Averill-Bates, 2005), des cellules leucémiques HL-60 (Poe and O'Neill 1997) ou dans des fibroblastes d'embryon de souris (Buzzard, Giaccia et al. 1998).

De plus, le choc thermique cause un déséquilibre au niveau de la mitochondrie menant soit à l'augmentation du taux d'ATP synthétisé, soit à la perte de ses activités métaboliques et la chute du potentiel membranaire (Schlesinger 1994). De telles altérations se traduisent le plus souvent par la libération de plusieurs facteurs pro-apoptotiques, entre autres le cytochrome c et l'AIF. La cascade apoptotique est souvent induite par les conséquences (Matsuki, Iuchi et al. 2003).

Les effets du choc thermique s'étendent aussi sur la deuxième voie de la machinerie apoptotique faisant intervenir les récepteurs de morts. En effet, il a été démontré que le choc thermique pourrait causer des dommages au niveau de la membrane et affecter sa fluidité. L'exposition des cellules Jurkat et des cellules HeLa

au choc thermique s'est avérée responsable de l'induction de l'apoptose par la voie du récepteur de mort Fas. Il a été démontré également que le choc thermique est responsable de la baisse de l'expression de la protéine Flip et de l'activation subséquente de la caspase 8 (Tran, Meinander et al. 2003). D'autres recherches ont pu montrer une augmentation du taux de la protéine adaptatrice FADD sous l'effet du choc thermique dans des hépatocytes. Une telle augmentation serait responsable de l'activation des récepteurs Fas et MORT1 (Kim, Wang et al. 2002). Dans d'autres études, l'induction de l'apoptose chez les cellules HL-60 par l'hyperthermie (42°C) a été liée à l'induction de la voie des récepteurs de mort sans que le niveau des protéines Bax et Bcl-2 ne varie (Katschinski, Robins et al. 1999). Nous envisageons de poursuivre ce projet en analysant de manière approfondie l'effet du choc thermique dans le contrôle de l'apoptose médiée par la voie du récepteur Fas dans des cellules tumorales humaines et en explorant le lien qui pourrait exister entre cette voie et la voie mitochondriale suite au clivage de Bid.

L'exposition cellulaire à une élévation de température ou à d'autres agressions induit à la fois une diminution de la traduction des ARN messagers et de la synthèse des protéines cellulaires normales. Ceci est la conséquence de l'inhibition de certaines activités enzymatiques et des altérations morphologiques affectant non seulement la voie mitochondriale et la voie des récepteurs de mort, mais également le RE. Dans certaines conditions de stress (maladies neurodégénératives, mutations des protéines sécrétrices, des aberrations du métabolisme lipidique, etc.), les protéines de conformation anormale peuvent s'accumuler dans le RE et déclencher la réponse UPR. Le choc thermique, lui aussi, est responsable de l'altération des mécanismes de transport des glycoprotéines entre le RE et l'appareil de Golgi ainsi que de l'accumulation des protéines dénaturées dans le RE (540 Trotter et al., 2002), ce qui pourrait activer l'apoptose. Il faut signaler de même que le choc thermique est responsable de l'activation des voies de signalisation cellulaire dont celles des MAP kinases (p38, MEK...; (Dorion and Landry 2002)) et de la protéine ASK-1 (Dorion,

Lambert et al. 2002). Or, l'activation de cette protéine est l'une des étapes les plus importantes dans l'apoptose induite par le stress du RE (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002) et/ou par les récepteurs de mort. Le choc thermique peut également induire une altération de l'homéostasie calcique suite à l'altération de la fluidité membranaire (Kantengwa, Capponi et al. 1990; Kiang, Gist et al. 1998).

Cependant, une exposition brusque et courte au choc thermique est responsable de l'induction des protéines du choc thermique. De tels effets sont à l'origine d'un phénomène de tolérance au stress multiple appelé « thermotolérance ».

6.2 La thermotolérance

Une exposition des cellules à des températures élevées pourrait avoir comme conséquence la synthèse compétitive des HSPs, connues pour leur rôle dans la protection des cellules contre un choc thermique subséquent, ainsi que contre d'autres formes de stress tels que le stress oxydatif, les radiations, etc.. (Sreedhar and Csermely 2004). Nos travaux antérieurs ont démontré que la thermotolérance peut être induite à une température moins élevée et non létale (40°C). Ceci est d'une importance notable pour la recherche fondamentale étant donné qu'il s'agit de la température physiologique de la fièvre chez l'être humain (Przybytkowski, Bates et al. 1986), suggérant ainsi la possibilité de son application en médecine clinique.

De même, une exposition des cellules à des températures létales (par exemple 43 et 45°C) durant une période courte, allant de 10 à 30 minutes, pourrait permettre le développement d'une adaptation de la cellule et sa résistance à un choc thermique consécutif (Subjeck, Sciandra et al. 1982; Samali and Cotter 1996). L'induction d'un état de thermotolérance se fait en 3 phases :

1. L'induction où apparaissent au niveau plasmatique des protéines du choc thermique responsables d'une protection cellulaire en cas de stress;
2. Le développement où l'on observe une réponse métabolique (adaptation du

pH et élimination des toxines.);

3. Le retour à la normothermie grâce à une déperdition calorique.

L'acquisition de cette propriété de thermotolérance est caractérisée par de nombreuses modifications biochimiques et moléculaires. Des analyses protéomiques visant à caractériser la thermotolérance ont montré un changement dans le processus de phosphorylation de 93 protéines chez les cellules thermotolérantes TR-RIF-1 versus les cellules contrôles non thermotolérantes RIF-1. La majorité de ces protéines exercent des fonctions biologiques très importantes : nous pouvons citer les protéines chaperones, les protéines formant les canaux anioniques, les protéines de signalisation (MAP kinases), les protéines de structure, les protéines impliquées dans le processus de transcription et de traduction de l'ARN et les protéines jouant un rôle dans la synthèse protéique, l'oxydoréduction, le métabolisme énergétique ou la motilité cellulaire (Kim, Song et al. 2002). Le rôle de certains ions dans l'acquisition de la résistance au choc thermique chez les eucaryotes a été également élucidé. Dans ce contexte, on peut citer le cas du Ca^{2+} qui intervient pour réguler la liaison du HSF au HSE dans des cellules humaines tumorales HeLa (Mosser, Kotzbauer et al. 1990) (issues d'un carcinome du col utérin). Ce recrutement de HSE par HSF-1 s'est avéré essentiel pour induire la synthèse des HSPs dans les cellules humaines A-431 (Kiang, Carr et al. 1994). Une extrapolation de ces résultats sur les cellules végétales, plus précisément les cellules du blé, a montré l'importance de la voie dépendante de Ca^{2+} /calmoduline dans l'acquisition de la résistance au choc thermique (Liu, Choi et al. 1990).

D'un autre côté, les protéines de stress jouent un rôle important dans le maintien de la thermotolérance. Plusieurs études suggèrent la corrélation entre l'accumulation de certaines formes de HSPs (HSP 30, HSP 70, et HSP 90) et l'acquisition d'un état de thermotolérance chez les amphibiens, les mammifères (Parsell and Lindquist 1993; Favatier, Bornman et al. 1997; Krebs and Feder 1997) de même que les poissons (Evans, Belak et al. 2007; Podrabsky and Somero 2007). En outre, le maintien de la

synthèse protéique chez les cellules thermotolérantes, même suite à l'exposition à des températures extrêmes, a été expliqué par la capacité des HSPs à maintenir la traduction et l'élongation ainsi qu'à prévenir la rupture des poly-ribosomes (De Maio, Beck et al. 1993; De Maio, Beck et al. 1993; Beck and De Maio 1994). D'autres études précédentes ont montré que l'état de thermotolérance est corrélé à une augmentation de la synthèse des HSPs 110. Ces dernières contribueraient à la solubilisation des protéines inactivées par la chaleur et présentes sous forme d'agrégats insolubles (Kampinga 2006). Toutefois, cette activité qui consiste à prévenir toute agrégation irréversible des protéines dénaturées suite à l'exposition subséquente aux chocs thermiques varie en fonction du type cellulaire et de la HSP induite.

Chez les bactéries et les levures, l'état de thermotolérance a été fortement corrélé à l'accumulation d'un disaccharide, le tréhalose, jouant un rôle dans la renaturation des protéines en conditions de stress (Singer and Lindquist 1998). Ceci explique d'ailleurs l'accumulation de tréhalose et la hausse de la quantité du glycogène synthétisé chez les cellules rendues thermotolérantes (Cameron, Levin et al. 1988). D'autres recherches ont montré que l'exposition des levures à un choc thermique doux induit l'augmentation des sphingolipides, caractérisés par leur rôle dans la protection des cellules contre les agents pathogènes et le maintien de l'équilibre. Ils sont connus aussi par leur effet dans le ralentissement du processus de vieillissement cellulaire (Dickson, Sumanasekera et al. 2006; Guangzuo, Gruhler et al. 2008).

Il est à noter aussi que l'effet de la thermotolérance est transitoire et dure environ de deux à trois jours, ce qui rend son utilisation en clinique possible et non désavantageuse pour l'application de l'hyperthermie létale.

En conclusion, l'hyperthermie avec ses deux aspects, létal et non létal, représente un exemple spectaculaire de la réponse d'une cellule aux agressions cytotoxiques de son environnement. Elle suscite l'intérêt de la communauté scientifique qui souhaite acquérir une meilleure compréhension de ce phénomène. Dans cette étude, on

s'intéressera à l'hyperthermie létale en vue d'une utilisation clinique comme possibilité thérapeutique à combiner aux autres méthodes classiques du traitement du cancer telles que la chimiothérapie et la radiothérapie. On s'intéressera également à la thermotolérance qui procure l'exemple le plus spectaculaire de la capacité des cellules à lutter pro-activement contre diverses agressions toxiques, y-compris l'hyperthermie létale.

CHAPITRE VII : INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE STRESS OXYDATIF

7.1 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres oxygénés en faveur de ces derniers. Chez les organismes aérobiques, le processus d'oxydation est indispensable pour mieux préserver de nombreuses réactions chimiques y compris la transformation des aliments en énergie et en chaleur, ainsi que les réactions immunitaires visant à détruire tout pathogène. Cependant, ces mêmes réactions génèrent des espèces oxygénées activées (RLO) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire étant donné leur capacité d'endommager les composés vitaux des cellules, entre autres les lipides, les protéines et l'ADN (Sies 1993; Orrenius 2007). Plus précisément, on définit les EORs comme étant une forme particulière d'espèces chimiques possédant un électron célibataire et non apparié sur leurs orbitales externes. De plus, ils sont caractérisés par une très forte réactivité et une courte durée de vie. Cette définition englobe à la fois les radicaux libres oxygénés et les radicaux non oxygénés. Cependant, la première classe reste la plus documentée étant donné sa nocivité pour les tissus et les molécules biologiques.

7.2 Les espèces réactives oxygénées ou EORs

La production d'espèces réactives oxygénées (superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical peroxyde, etc.) peut être aussi bien endogène qu'exogène (Tableau 7.1). En effet, il est connu que les globules blancs génèrent le radical peroxynitrite à partir du radical superoxyde ou du monoxyde d'azote (NO^\bullet). Ce dernier est également produit par les parois des vaisseaux sanguins ainsi que les cellules du cerveau (Griendling and Ushio-Fukai 2000). Chez les êtres aérobies, l'anion superoxyde aussi bien que le

peroxyde d'hydrogène sont formés par la voie des pentoses phosphates lors de la synthèse d'oxalate et de l'hème ainsi que dans le catabolisme des acides aminés, des catécholamines et des acides gras (Zabucchi, Bellavite et al. 1980). Comme source exogène de radicaux libres oxygénés, on cite les rayons X et l'exposition aux rayons UV du soleil, générant ainsi les EORs soit directement ou indirectement via des molécules apparentées (Huang, Li et al. 2001; Huang, Li et al. 2001). De même, un excès en fer ou en cuivre favorise les réactions de transition, particulièrement celle de Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle. Récemment, plusieurs travaux ont exploré le lien entre la génération d'EOR et la pollution atmosphérique, l'alimentation, le tabagisme ou les habitudes personnelles comme le bronzage intensif.

Les EORs sont très réactives avec leur environnement. Leur présence en quantités modérées s'est avérée nécessaire pour le bon déroulement de plusieurs voies métaboliques, entre autres la dissociation des acides gras et plus particulièrement celle du cholestérol LDL (Bauer and Bauer 1999; Bauer, Sotnikova et al. 1999). Ceci permet donc d'éviter de nombreuses maladies liées au cholestérol comme les maladies cardiaques, l'apoplexie, l'athérosclérose et l'endommagement des artères (Harrison, Griendling et al. 2003; Harrison, Cai et al. 2003). De plus, le stress oxydatif est connu pour être impliqué dans de nombreuses maladies multifactorielles telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

7.3 Nocivité des EORs

Les sources métaboliques produisant les EORs sont très nombreuses. On cite à titre d'exemple la chaîne respiratoire mitochondriale, la famille des cytochromes P-450, l'activité de la NADPH oxydase, de la myéloperoxydase, de la NO synthase et celle de la xanthine oxydase. Ces EORs sont à l'origine de nombreux dommages tant au niveau cellulaire que moléculaire. Parmi les effets nocifs des EOR, on cite l'oxydation des protéines et des acides aminés, conduisant ainsi à une perte de la

structure et donc du site actif dans le cas des enzymes. Pour approfondir, la sensibilité des protéines aux effets d'EOR varie en fonction de la structure et de la composition de la protéine (Bongarzone, Pasquini et al. 1995). Ainsi, les protéines les plus sensibles sont celles comportant un groupement sulfhydryle (SH). Les radicaux libres sont également responsables de nombreuses altérations de la structure des acides nucléiques, entre autres la conversion des résidus thymines en 8-hydroxyguanine et l'oxydation du déoxyribose (Gao, Wei et al. 2004; Giommarelli, Corti et al. 2008). La peroxydation lipidique pourrait affecter la structure des membranes cellulaires. Quant aux glucides, leur oxydation en présence des ions métalliques est responsable de la libération d'aldéhydes. Ces derniers s'attachent aux protéines, provoquant ainsi la rupture de la chaîne peptidique et par conséquent leur dénaturation (Dandekar, Nadkarni et al. 2002).

7.4 Mécanismes de défenses cellulaires contre les EORs

Pour assurer le maintien du niveau non cytotoxique d'EORs, l'organisme dispose d'une réserve importante de molécules anti-oxydantes de nature protéique ou sous forme de molécules oxydables hydrosolubles (glutathion, vitamine C, protéines plasmatiques, acide urique) et liposolubles (vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes, bilirubine, etc). Il s'agit d'un système de contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination d'EOR en excès et de la préservation des tissus et des cellules de leur nocivité. L'ensemble de ces agents est réparti en trois systèmes de défense (Tableau 7.2) :

- 1 Un système de défense antioxydant primaire groupant des antioxydants métalloenzymatiques (les superoxydes dismutases Cu-Zn et Mn, la catalase, les glutathion peroxydases, le couple thiorédoxine-thiorédoxine réductase, etc.);
- 2 Un système de défense antioxydant secondaire groupant des antioxydants de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, le groupe des vitamines

A, C, E, caroténoïdes, ubiquinone) et d'oligoéléments (sélénium, zinc).

- 3 Un troisième système de défense groupant les enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques.

Tableau 7.1 : Liste des différentes espèces oxygénées. Les radicaux libres oxygénés sont nombreux et sont très réactifs avec leur environnement. De plus, ils sont responsables de la toxicité de l'oxygène et de ces effets mutagènes bien qu'indispensable dans plusieurs méca-nismes moléculaires des tissus de l'organisme dont la réponse immunitaire

Nature de l'espèce oxygénée	Formule chimique	Source	Effets biologiques
Anion superoxyde	O_2^-	Réduction univalente de l'oxygène O_2	Peu toxique par lui même, mais il génère le radical hydroxyle OH^\cdot
Radical hydroxyle	OH^\cdot	Clivage et réduction de l'eau oxygénée Réaction de Haber-Weiss (en présence de Fer)	Oxyder tout les substrats du milieu environnant Source potentielle des lésions moléculaires, cellulaires et tissulaires Désintégration de la membrane cellulaire
Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygenée	H_2O_2	Réaction de dismutation de l'anion superoxyde Réaction de réduction univalente de O_2^- Réaction de réduction directe de l'oxygène	Générateur du radical hydroxyle
peroxynitrite	NO_2^-	Réaction entre l'oxygène et le NO	Cytotoxique et oxydant pour les résidus méthionines, thiols et thioéthers
Radicaux peroxydes	ROO^\cdot	Résultat d'interaction des radicaux libres de carbone avec l'oxygène moléculaire	Peu actif, capable de diffuser à travers les membranes biologiques
Hydroxydes organiques	$ROOH$	Forme protonnées des radicaux peroxydes	Très réactifs et se décomposent rapidement en radicaux alcoxydes
Radicaux alcoxydes	RO^\cdot	Résultat de dégradation de peroxydes organiques	Très réactifs

Tableau 7.2 : Liste des différents antioxydants : les antioxydants peuvent être classés en oxydant endogène synthétisés par l'organisme et d'autres exogènes apportés par l'alimentation. Leurs actions varient selon la nature de l'antioxydant. Certains d'entre eux assurent une protection continue alors que d'autres agissent suite à un stress et assurent par conséquent une détoxification active ou passive.

Anti-oxydant	Voie d'apport	Niveau de défense	Action
Transferrine Lactoferrine Hémosidérine Cerruloplasmine	Endogène	Ligne de défense continue	Transport de fer et de cuivre
Coenzyme Q10	Endogène	Ligne de défense continue	Prévention des réactions radicalaires dans les mitochondries
Acide urique	Endogène	Ligne de détoxification passive	Neutralisation des RLO dans les compartiment extra-cellulaires
Melatonine	Endogène	Ligne de détoxification passive	Hormone anti-oxydante
Albumine	Endogène	Ligne de détoxification continue	Neutralisation des RLO Protéines chélatrices de cuivre
Cu SOD Zn SOD Mn SOD	Endogène	Ligne de détoxification active	Neutralisation et transformation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène
GSH-transférase GSH-sélénium dépendante ou GSH-transférase	Endogène	Ligne de détoxification active	Elimination du peroxyde d'hydrogène et des lipoperoxydes

Anti-oxydant	Voie d'apport	Niveau de défense	Action
Vitamine E	exogène	Ligne de détoxification passive	Protonation des radicaux peroxydes et alcoxydes des acides gras → arrêt de la l'oxydation lipidique
Vitamine C	exogène	Ligne de détoxification passive	Activité semblable à celle de la vitamine E Forte réactivité avec l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, perhydroxyle et peroxydes Régénération de la vitamine E et du β-carotène
Carotenoides	exogène	Ligne de détoxification passive	Neutralisation des radicaux libres dans les milieux gras et protection des membranes, des graisses circulantes et des protéines
polyphénols	exogène	Ligne de détoxification passive	Puissants agents antioxydants Abaissent le taux de mauvais cholestérol (LDL) et celui d'agrégation des et dégagent les artères
Terpènes	exogène	Ligne de détoxification passive	Puissants anti-oxydants Possédant des effets de synergie avec la vitamine E
Oligoéléments	exogène	Ligne de détoxification passive	Composants d'enzymes anti-oxydantes (SOD)
Cystéines	exogène	Ligne de détoxification passive	Précurseurs de glutathion

Anti-oxydant	Voie d'apport	Niveau de défense	Action
Acide phylique	exogène	Ligne de détoxification passive	Minimiser la concentration des minéraux qui peuvent donner naissance à des RLO
Sulfo...	exogène	Ligne de détoxification passive	Induit des enzymes de détoxification s'opposant à la formation du radical superoxyde
Thioredoxine réductases	endogène	Ligne de détoxification active	Enzyme utilisant le NADPH ou le glutathion pour neutraliser les effets des RLO
Diaphorase	endogène	Ligne de détoxification active	Enzyme qui empêche la réduction monovalente des quinones via l'utilisation de NADH
L'hème oxygénase	endogène	Ligne de détoxification active	Méiateur et antagoniste du monoxyde d'azote

7.5 Stress oxydatif et apoptose

De faibles doses d'EOR permettent un bon déroulement de la signalisation et de la prolifération cellulaire (Burdon, Alliangana et al. 1994; Kamata and Hirata 1999; Kannan and Jain 2000). Cependant, à de fortes concentrations, les EORs deviennent dangereux pour les cellules et constituent l'un des facteurs les plus importants de la cancérisation (Szatrowski and Nathan 1991; Burdon 1995). En effet, l'activation continue des facteurs de transcription impliqués dans la carcinogenèse (NF- κ B et AP-1) est corrélée à une surproduction d'EOR (Gupta, Rosenberger et al. 1999). Il a aussi été démontré que les dommages au niveau de l'ADN peuvent conduire les cellules au processus de prolifération tumorale (Jackson and Loeb 2001). De fortes doses d'EOR conduisent à la peroxydation lipidique, induisant l'altération de la membrane cytoplasmique et la libération du contenu cellulaire vers l'extérieur suivant un processus nécrotique. Des concentrations moins élevées des espèces réactives de l'oxygène induisent l'apoptose tout en activant les protéines kinases et les protéines phosphatases (Kannan and Jain 2000).

7.5.1 Induction de la voie mitochondriale par les EORs

La mitochondrie est la principale source d'EOR durant l'apoptose (Cai and Jones 1999). Elle est à la fois cible et source d'EOR (Simon, Haj-Yehia et al. 2000; Shibata and Kobayashi 2008). Les EORs sont responsables de l'oxydation des thiols protéiques et des pores mitochondriaux, causant ainsi la libération du cytochrome C (Zamzami, Marchetti et al. 1995; Costantini, Chernyak et al. 1996; Kroemer and Reed 2000). Dans plusieurs études, le niveau d'EOR affecte l'expression de Bcl-2. Cependant, ces mêmes études ont montré qu'un tel effet n'est pas suffisant pour accomplir le processus d'apoptose (Maulik, Goswami et al. 1999). Par ailleurs, la

surexpression de la catalase a été corrélée au taux de Bcl-2 phosphorylé et à la protection contre l'apoptose. Des résultats semblables ont été observés chez des cellules surexprimant la MnSOD (Patel and Day 1999; Deng, Gao et al. 2003). Les antioxydants peuvent aussi protéger les lymphocytes T contre l'apoptose induite par la voie mitochondriale, indépendamment de la voie des récepteurs de mort, via le contrôle de l'expression des protéines Bcl-2 (Hildeman, Mitchell et al. 1999; Hildeman, Zhu et al. 2002). Par exemple, l'action protectrice de l'antioxydant MnTBAP pourrait impliquer le facteur de transcription CREB (cAMP response-element binding protein), le facteur de transcription NF- κ B et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) qui sont tous connus pour leur rôle dans l'induction de l'expression de Bcl-2. Cependant, il a été rapporté que les EORs peuvent affecter les activités de ces facteurs (Ahmed, Sells et al. 1997; Gong, Chen et al. 1999; Pugazhenth, Nesterova et al. 2000; Xu, Lian et al. 2007). Les EORs interviennent également dans la régulation de l'expression d'autres protéines de la famille Bcl-2 dont Bcl-xL ((Ermak, Lacour et al. 2008).

7.5 2 La voie des récepteurs de mort et les EORs

Une production d'EOR a été souvent observée au cours de l'apoptose induite par différents stimuli tels que APO-1/Fas (Korsmeyer, Yin et al. 1995; Um, Orenstein et al. 1996; Banki, Hutter et al. 1999). Les EORs sont responsables de l'altération de la membrane cellulaire et des changements caractéristiques de l'apoptose (Wang, Azad et al. 2008), amenant ainsi à l'activation des différents récepteurs membranaires tels que Fas (Kuckleburg, Tiwari et al. 2008; Nakajima, Kojima et al. 2008; Wang, Azad et al. 2008), TNF et TGF (Herrera, Fernandez et al. 2001). D'un autre côté, Meldrum et ses collaborateurs (1998) ont montré que les dommages causés par les EORs peuvent stimuler la production de cytokines, dont le TNF α qui est connu pour sa propriété proapoptotique (Meldrum, Dinarello et al. 1998); or cette activation dépend de plusieurs facteurs comme le taux d'EOR et l'activation de la voie des MAP

kinases. Malgré ces études, le mécanisme exact d'activation de la voie des récepteurs de mort par les EORs est encore méconnu et nécessite plus d'investigations.

CHAPITRE VIII : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le projet de doctorat porte sur les mécanismes de toxicité du choc thermique létal et l'effet protecteur de la thermotolérance induite à un choc thermique doux contre de telle agression. L'importance du sujet provient du fait que ce type de stress pourrait servir à induire la mort chez des cellules tumorales. L'approche en clinique consistera en l'application d'une hyperthermie létale (42-45°C) au niveau du tissu atteint par la tumeur. Toutefois, de belles perspectives existent pour l'utilisation combinatoire d'un choc thermique sévère (hyperthermie létale) et d'autres stratégies thérapeutiques plus conventionnels. Ainsi, à part le choc thermique, de plus faibles doses de chimiothérapie ou de radiothérapie peuvent y être combinées afin d'améliorer l'indice thérapeutique. Ceci se base sur les résultats de plusieurs études montrant que l'hyperthermie sensibilise les cellules tumorales à certains agents chimiothérapeutiques et aux radiations (Engin 1994; Baronzio and Hager; 2000). Par exemple, l'hyperthermie augmente la perméabilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques facilitant ainsi, leur pénétration intracellulaire (Baronzio et al., 2006). Les travaux en cours dans notre laboratoire exploitent cette piste et tentent de comprendre les mécanismes de sensibilisation des cellules tumorales à l'hyperthermie.

En ce qui a trait à la technologie, avec l'innovation dynamique et l'évolution perpétuelle des technologies médicales, il est désormais possible de focaliser le traitement à la chaleur sur une partie spécifique du tissu. La chaleur peut être, par exemple, appliquée par un laser, des micro-ondes ou des ondes radiofréquences, des ultrasons focalisés, etc. Ces technologies sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent de chauffer la zone de focalisation, de manière non invasive, profondément dans le tissu visé, sans chauffer de manière significative les tissus voisins de la zone de focalisation.

En plus de leur retombées cliniques, les résultats obtenus viseront à améliorer nos connaissances théoriques sur le choc thermique autant pour son aspect létal que

non létal. Bien que très populaire en Europe et au Japon à cause des résultats cliniques et pré-cliniques jugés prometteurs, au Canada, à l'encontre de ces autres pays, l'hyperthermie est encore méconnue, voir même, rarement utilisée par les praticiens. Aux États-unis et depuis le début des années 1990, l'hyperthermie trouve un accueil favorable auprès des oncologues. Juin 1996 est la date d'approbation de l'utilisation de l'hyperthermie locale pour le traitement du cancer de la prostate aux États-unis. Dès lors, l'hyperthermie est de plus en plus acceptée comme une technique efficace dans la lutte contre le cancer. Ceci nous mène à l'objectif général du projet qui consiste à soutenir l'intégration de l'hyperthermie comme possibilité thérapeutique anti-cancer au sein des établissements de santé canadiens. Toutefois, le succès de cette approche nécessite la compréhension approfondie et détaillée de tous ces concepts.

Ce projet, qui pourrait prendre une importance capitale pour la médecine clinique, englobe plusieurs sujets intéressants qui se répartissent principalement entre deux grandes thématiques : (1) Les mécanismes de toxicité du choc thermique et les voies de signalisation impliquées dans la réponse des cellules aux agressions cytotoxiques du choc thermique. Nous nous sommes intéressés en particulier, à l'étude du mécanisme d'induction de la mort cellulaire par apoptose. (2) Nous avons aussi mis l'accent sur l'effet protecteur de la thermotolérance contre la toxicité d'un choc thermique létal. Ainsi, se permet-on d'émettre les hypothèses suivantes :

- ❖ Le choc thermique induit l'apoptose via la voie extrinsèque médiée par le récepteur de mort.
- ❖ Le choc thermique induit également l'apoptose via la voie intrinsèque médiée par le réticulum endoplasmique.
- ❖ L'apoptose induite par le choc thermique survient suite à la génération des espèces réactives de l'oxygène qui, à leur tour, activent les protéines MAP kinases et la protéine p53.

- ❖ La thermotolérance induite par un choc thermique doux et non létal (40°C) protège les cellules contre l'induction de l'apoptose par un choc thermique subséquent plus sévère (42-45°C).

Afin de vérifier ces hypothèses, nos objectifs étaient de :

1. Déterminer les mécanismes de toxicité du choc thermique et déterminer le rôle de la voie du récepteur de mort Fas dans la transduction du signal apoptotique induit par le choc thermique.
2. Déterminer le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'activation des protéines MAP kinases et de la protéine p53 durant la transduction du signal apoptotique induit par le choc thermique.
3. Déterminer les mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose via la voie du réticulum endoplasmique par le choc thermique.
4. Évaluer l'effet protecteur de la thermotolérance induite à un choc thermique doux (40°C) contre la toxicité d'un choc thermique subséquent létal (42-45°C).

Objectif spécifique 1 : Comprendre les mécanismes de toxicité du choc thermique et déterminer le rôle de la voie du récepteur de mort Fas dans la transduction du signal apoptotique induit par le choc thermique chez les cellules HeLa.

Nous avons démontré précédemment que le choc thermique induit la voie mitochondriale de l'apoptose (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Or, il est bien établi que sous l'effet de certains types de stress, notamment le stress oxydatif, la voie mitochondriale survient comme conséquence de l'activation de la voie des récepteurs de mort Fas. Si c'est le cas, alors on s'attend à ce que la transmission du signal apoptotique survienne suite à une augmentation du niveau d'expression du Fas ligand et passe par la formation du complexe de signalisation de mort (DISC). Le complexe DISC est, en effet, la conséquence de l'agrégation du récepteur Fas et Fas ligand, la

protéine FADD et la procaspase 8. Suite à son activation par clivage, la caspase 8 clive et active la caspase 3. Par ailleurs, l'activation de la caspase 8 pourrait conduire au clivage de la protéine Bid, ce qui explique l'induction de la voie mitochondriale par le choc thermique.

D'un autre côté, une étude publiée en 1999 a montré que le choc thermique induit l'expression des interleukines, des cytokines et du ligand de mort $\text{TNF}\alpha$ (Katschinski, Robins et al. 1999). De plus, l'hyperthermie est connue pour reverser la résistance au $\text{TNF}\alpha$ chez les cellules L929 (Ko et al., 2000). Or, il est établi que la voie de signalisation aboutissant à la mort cellulaire en réponse au $\text{TNF}\alpha$, bien que complexe, peut induire l'activité de la caspase 8. Le récepteur 1 du TNF (TNF-R1) possède un domaine de mort comparable à celui de Fas ou des récepteurs de TRAIL, ce qui implique que les protéines FADD et caspase 8 peuvent être recrutés au TNF-R1 en réponse à l'engagement de ce dernier (Mak, Wong et al. 2002). Ainsi, afin de déterminer si le mécanisme d'activation de la caspase 8 par le choc thermique est médié par Fas, il sera pertinent d'inhiber l'activation du récepteur Fas (en utilisant l'antagoniste de Fas Kp7-6). De plus, il a été également démontré que l'activation du récepteur Fas pourrait conduire à l'activation de la caspase 10. Il sera par conséquent pertinent d'utiliser des inhibiteurs pour chacune des caspases 8 et 10 afin de distinguer laquelle des deux est impliquée dans la transduction du signal apoptotique induit par le choc thermique et médiée par le récepteur de mort Fas. De plus, l'utilisation de ces inhibiteurs ainsi que l'antagoniste de Fas permettra d'étudier les conséquences de l'activation de la voie du récepteur Fas par le choc thermique, soit l'activation de la voie mitochondriale et la phase d'exécution du processus apoptotique. Ceci permettra de déterminer le type de dialogue entre les deux voies, et de vérifier si l'activation de la voie mitochondriale dépend de la voie du récepteur de mort Fas. Dans cette optique, nous étudierons chez les cellules HeLa, pré-incubées ou non avec ces inhibiteurs et exposées au choc thermique (42-45°C), l'activation de la voie mitochondriale (translocation de Bax et relargage du cytochrome c dans le

cytosol), et l'induction de la phase d'exécution (activation de la caspase 3, clivage de PARP et ICAD et condensation de la chromatine).

Il serait également congruent d'étudier les conséquences de l'induction du phénomène de la thermotolérance sur le déroulement de ces cascades signalétiques mentionnées ci-dessus et de vérifier si la thermotolérance conférerait aux cellules HeLa un effet protecteur contre l'induction de la voie du récepteur de mort Fas par le choc thermique.

Par ailleurs, selon Varfolomeev, la caspase 8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev, Schuchmann et al. 1998). Cependant, plusieurs autres études contredisent cette doctrine (Yang, Khosravi-Far et al. 1997). En effet, la mort cellulaire induite par Fas pourrait emprunter une autre voie caspases-indépendante, impliquant la protéine Daxx, la protéine kinase ASK-1 et des MAP kinases. Par ailleurs, il a été démontré d'une part, que l'activation de la voie SAPK/JNK pourrait conduire à la génération de radicaux libres activant ainsi des MAP kinases et la protéine p53 et que, d'autre part, l'hyperthermie causerait une augmentation du taux de radicaux libres (Flanagan, Moseley et al. 1998; Moriyama-Gonda, Igawa et al. 2000). Prises dans leur ensemble, ces données nous acheminent au deuxième objectif de notre étude.

Objectif spécifique 2 : Déterminer le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'activation des protéines MAP kinases et de la protéine p53 durant la transduction signal apoptotique induit par le choc thermique : Effet protecteur de la thermotolérance.

L'activation de la protéine ASK-1 suite au recrutement de Daxx au niveau du récepteur Fas sera étudiée chez les cellules HeLa exposées au choc thermique (42-45°C). De même, l'étude du niveau de phosphorylation des MAP kinases p38 et JNK, ainsi que celui de leurs substrats respectifs; HSP27, p53 et c-Jun, sera effectuée pour

déterminer le rôle de ces deux MAP kinases dans la régulation du processus apoptotique induit par le choc thermique. La phosphorylation de Bax par JNK résulte en sa relocalisation au niveau de la membrane mitochondriale, alors que la phosphorylation de Bcl-2 par p38 l'inactive.

Ainsi, nous utiliserons l'antagoniste de Fas (Kp7-6) pour étudier le rôle de ce dernier dans l'activation de la voie des MAP kinases et dans la transduction du signal apoptotique via les protéines p38 et JNK. Nous utiliserons également l'inhibiteur de p38 (SB328020) pour déterminer si cette protéine induit la phosphorylation de p53 et de Bcl-2. L'inhibiteur de la JNK (PD98059) quant à lui, sera utilisé pour investiguer le rôle de la JNK dans la phosphorylation de c-Jun et la translocation de Bax au niveau de la mitochondrie. Toutefois, ces deux inhibiteurs seront utilisés pour expliquer l'implication de la JNK et de la p38 dans la transduction du processus apoptotique; soit l'activation de la voie mitochondriale (chute du potentiel membranaire et relargage du cytochrome c dans le cytosol) et l'induction de la phase d'exécution de l'apoptose (activation de la caspase 3 et condensation de la chromatine).

Nous investiguerons également si le choc thermique induit la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les conséquences que ceci pourrait y avoir sur la transduction du signal apoptotique. Nous utiliserons à cette fin des antioxydants tels que la PEG-catalase, enzyme impliquée dans la détoxification des ROS, pour comprendre le rôle de ces derniers dans l'activation du récepteur Fas et les événements moléculaires qui suivent tels que l'activation des protéines kinases p38 et JNK, l'activation de la protéine p53, la chute du potentiel membranaire, le relargage du cytochrome c dans le cytosol, l'activation de la caspase 3 et la condensation de la chromatine.

Cependant, plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'activation de la protéine p53 et vice-versa. Pour déterminer si c'est les ROS qui activent la protéine p53 ou c'est la génération du ROS

qui stimule la phosphorylation de p53, nous proposons d'utiliser l'inhibiteur de la p53 (pifithrine α) et d'observer le niveau de ROS générés par le choc thermique.

A part son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, p53 pourrait induire la transcription de plusieurs facteurs impliqués dans l'apoptose (Bax, Fas ligand) et réprimer celle de certains autres (Bcl-2, Bcl-XL). Nous vérifierons, ainsi, si le choc thermique pourrait moduler l'expression de ces facteurs en utilisant la pifithrine- α .

Nous soutenons enfin, l'hypothèse que le choc thermique, comme d'autres stress (notamment le stress oxydatif et les radiations (Nithipongvanitch, Ittarat et al. 2007; Sot, Freund et al. 2007) pourrait induire la relocalisation de p53 au niveau de la mitochondrie, où elle causerait la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en se complexant à Bcl-2 et/ou Bcl-XL via son domaine de liaison à l'ADN (Mihara and Moll 2003; Petros, Gunasekera et al. 2004). L'immunoprécipitation du complexe p53/Bcl-2 ou p53/Bcl-xL permettra de consolider cette hypothèse. Nous investiguerons également l'effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C contre la succession de l'ensemble de ces événements pro-apoptotiques.

Par ailleurs, il a été démontré que la protéine ASK-1 pourrait être transloquée sous l'effet de certains stress (en particulier le stress oxydatif) à la membrane du réticulum endoplasmique où elle se lie à la protéine Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1). Le recrutement de ASK-1 par IRE1 survient uniquement en cas de stress du réticulum endoplasmique et lorsque IRE1 est activée. Il a été également proposé que la voie des MAP kinases JNK pourrait être activée en réponse à un stress du RE et promeut la mort cellulaire chez les mammifères (Urano, Wang et al. 2000). De plus, plusieurs études ont montré que chez les cellules HeLa, l'exposition au choc thermique (42-45°C) résulte en l'accumulation des protéines à conformations anormales (Kampinga, Brunsting et al. 1995; Kretz-Remy, Munsch et al. 2001; Lepock 2005). A la lumière de ces données, nous avons décidé d'investiguer si le choc thermique induit l'apoptose via la voie du réticulum endoplasmique.

Objectif spécifique 3 : Déterminer les mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose via la voie du réticulum endoplasmique par le choc thermique : Effet protecteur de la thermotolérance.

Dans cette perspective, nous avons entrepris de vérifier la capacité d'un choc thermique létal à induire la voie de l'apoptose médiée par le RE. Nous avons également entrepris de déterminer l'importance et l'ampleur de cette cascade signalétique par rapport à la voie mitochondriale et la voie du récepteur de mort Fas.

Le stress du RE pourrait être un déterminant de la sensibilité intrinsèque des cellules à la dénaturation protéique causée par le choc thermique. En d'autres termes, l'induction de l'apoptose via la voie du réticulum endoplasmique pourrait être due, en partie, à l'accumulation des protéines à conformation anormale au niveau du RE. Les caractéristiques de l'apoptose médiée par la voie du RE sont généralement la perte de l'homéostasie calcique, l'activation des caspases 12 et 4 ainsi que l'activation des calpaïnes.

A cette fin, nous commencerons par déterminer si le choc thermique induit l'apoptose via le RE. Dans ce cas, trois mécanismes pourront se manifester :

- ❖ Le premier implique le facteur de transcription CHOP/GADD153, dont la surexpression et la relocalisation nucléaire provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Barone, Crozat et al. 1994; Wang, Lawson et al. 1996).

- ❖ Le second mécanisme s'effectue par l'activation de la kinase JNK. Celle-ci serait activée via IRE1 α ou IRE1 β qui se trouvent ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique. L'endonucléase IRE1 se lie à la protéine adaptatrice TRAF2 facilitant le recrutement et l'activation de la protéine ASK1.

- ❖ Le troisième mécanisme met en jeu la perte de l'homéostasie calcique et l'augmentation du taux de calcium libre dans le cytosol. Si c'est le cas, les conséquences qui pourront en découler sont l'activation des caspases 12 et/ou la caspase 4.

Ainsi, nous supposons que le choc thermique induirait l'apoptose tout en causant la perte de l'homéostasie calcique et une augmentation du taux de calcium libre dans le cytosol et l'élévation du taux du calcium pourrait résulter en l'activation des calpaïnes qui activeront à leur tour les caspases 4 et/ou 12. D'un autre côté; la translocation de la forme active de la caspase 7 vers le réticulum endoplasmique pour activer la caspase 12 est aussi une possibilité à envisager dans cette étude. Finalement, nous envisageons étudier le rôle du choc thermique dans la modulation du niveau d'expression de certaines protéines de la famille Bcl-2 (Bax, Bik, Bak, Bcl-2, Puma et Noxa) connues pour réguler l'homéostasie calcique et l'intégrité des membranes du RE et de la mitochondrie.

Par ailleurs, il a été démontré que l'altération de l'homéostasie calcique suite à l'entrée massive de calcium extracellulaire ou le relargage du stock calcique dans le cytosol favorise l'action de protéases qui sont calcium-dépendantes et conduit à l'apoptose (Enfissi et al., 2004). Ainsi, afin de clarifier le rôle du calcium intra- et extracellulaire dans le déroulement de la cascade apoptotique, nous utiliserons le BAPTA et BAPTA-AM connus pour être deux puissants chélateurs du calcium extra- et intracellulaire, respectivement. Les deux chélateurs seront utilisés pour déterminer le rôle du calcium dans l'activation des caspases 4 et 12 suite à leur clivage et activation par les calpaïnes. BAPTA et BAPTA-AM seront également utilisés pour voir si le calcium est responsable de la chute du potentiel membranaire et la libération du cytochrome c dans le cytosol résultant en l'activation de la phase d'exécution de l'apoptose (activation de la caspase 3 et condensation de la chromatine). A notre connaissance, le rôle de calcium dans la transduction de ces signaux pro-apoptotiques n'a jamais été démontré chez des cellules eucaryotes exposées au choc thermique.

Enfin, l'effet de la thermotolérance induite à 40°C sera étudié tout au long de cette partie de l'étude. Nous supposons que la thermotolérance protégerait les cellules contre l'augmentation du niveau d'expression de CHOP, la perte de l'homéostasie

calcique, l'activation des caspases 4 et 12 ainsi que contre l'activation des calpaïnes par un choc thermique létal (42 à 45°C).

Pour conclure, nous jugeons que cette étude apportera de nouvelles connaissances en ce qui a trait aux mécanismes de toxicité du choc thermique et au phénomène de défenses cellulaires permettant aux cellules de résister non seulement au choc thermique mais également à une pléthore de stress. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet seront d'une importance capitale autant pour la recherche fondamentale que pour la recherche clinique.

CHAPITRE IX : RÉSULTATS ET CONTRIBUTIONS

1) Mes contributions les plus importantes

Cette section liste les travaux réalisés durant mes quatre ans de doctorat que j'ai passé dans le laboratoire du Dr. Diana Averill. Dix publications sont les fruits de ces années de travail sous la supervision du Dr. Diana Averill. Le choix de l'ordre des coauteurs utilisé dans mes publications est la contribution de chacun des coauteurs.

1.1 - Articles découlant de mon projet de doctorat :

Les trois articles qui découlent de ma thèse de doctorat intitulée «Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C» sont sans équivoque les contributions les plus importantes de ma jeune carrière. En fait, ils en constituent le point d'assise. Leur enjeu est fondamental, tant du point de vue de la recherche que pour le domaine clinique. Voici ces contributions :

1- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2008, THERMOTOLERANCE INDUCED AT A FEVER TEMPERATURE OF 40°C PROTECTS CELLS AGAINST HYPERTHERMIA-INDUCED APOPTOSIS MEDIATED BY DEATH RECEPTOR SIGNALLING. Article publié en Biochemistry and cell Biology, 186; 1-18

2-Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2008, ACTIVATION OF STRESS-ACTIVATED MAP KINASES REGULATES HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS IN HELA CELLS. Manuscript en préparation pour soumission.

3-Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2008, THERMOTOLERANCE INDUCED AT A MILD TEMPERATURE OF 40°C PROTECTS CELLS AGAINST HEAT SHOCK-INDUCED ER STRESS: ROLE OF CALCIUM IN ER-MEDIATED APOPTOSIS.

1.2 - Articles découlant de ma participation dans d'autres projets dans le laboratoire du Dr. Diana Averill :

4- Bettaieb, A.Ouellet, M. E. et Averill-Bates, D. 2008, STUDY OF PRO-APOPTOTIC PROPERTIES OF CARNOSIC ACID (A NATURAL ANTIOXIDANT). Manuscript en préparation pour soumission.

5- Bettaieb, A.Ouellet, M. E. et Averill-Bates, D. 2008, INDUCTION OF DEATH RECEPTORS PATHWAY OF APOPTOSIS BY CARNOSIC ACID. Manuscript en préparation pour soumission.

Également, durant mon parcours académique, j'ai voulu axer mon travail sur l'étude des propriétés anti-tumorales d'un anti-oxydant naturel. Cette étude prend racine dans l'intérêt croissant que porte la médecine clinique pour les médicaments naturels. Dans cette étude, nous avons essayé d'étudier le pouvoir anti-oxydant et anti-tumoral d'un extrait de plante déjà commercialisé et dont les propriétés sont encore méconnues: il s'agit de l'acide carnosique, un extrait normalisé de feuilles de romarin. Deux publications dont je suis le premier auteur découlent de cette étude et sont prêtes pour soumission.

6- Bettaieb, A., Merlet S. et Averill-Bates, D. 2008, INDUCTION OF APOPTOSIS IN T24 BLADDER CANCER CELLS BY CYCLOPHOSPHAMIDE. Manuscript en préparation pour soumission.

J'ai étudié, en parallèle les propriétés anti-tumorales du cyclophosphamide, un agent chimiothérapeutique utilisé en clinique et dont les propriétés pro-apoptotiques sont encore méconnues. La partie expérimentale de cette étude est achevée et la publication est en phase de préparation.

1.3 - Article découlant de collaboration scientifique:

7- Hachimi, S.Y., Bettaieb, A., Fontaine, N., Breau, L., et Averill-Bates, D. 2008, DERIVATIVES OF BREVIFOLIOL AS INHIBITORS OF P-GLYCOPROTEIN- AND MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN-MEDIATED EFFLUX OF

DOXORUBICIN IN MULTIDRUG-RESISTANT CHINESE HAMSTER CELLS.

Manuscript en préparation pour soumission.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Livain Breau du département des sciences biologiques auquel j'ai participé, nous avons investigué la possibilité d'inhiber la résistance multiple aux médicaments anticancéreux par des dérivés du brevifoliol, un composé de la famille des taxanes. Ces dérivés ont été synthétisés dans le laboratoire du Dr. Livain Breau après l'extraction de brevifoliol à partir des aiguilles de l'arbre *Taxus Brevifolia*. Dans le laboratoire du Dr. Diana Averill, j'ai étudié avec monsieur Nicolas Fontaine (étudiant en Baccalauréat en Biochimie à L'UQAM) les effets de ces dérivés sur la fonction de la P-glucoprotéine, une protéine à la base du phénomène de la résistance multiple aux médicaments anticancéreux. Les recherches effectuées visaient à développer de nouveaux dérivés pour l'inhibition de la PGP. La partie expérimentale est achevée et nous avons obtenus des résultats pertinents pour une publication.

1.4 - Articles découlant de ma participation dans les projets d'autres étudiants du laboratoire du Dr. Diana Averill :

Dans le cadre de projets annexes, j'ai participé à améliorer la qualité scientifique de plusieurs travaux effectués par certains de mes collègues au laboratoire. Ma contribution à ces études consistait à faire des expériences permettant d'amener des explications aux faits observés.

8- Wrzal, K. P., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2008, MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOSIS ACTIVATION BY HEAT SHOCK IN MULTIDRUG-RESISTANT CHINESE HAMSTER CELLS. Article publié en « Radiation research ». Oct; 170(4) : 498-511

9- Wang, Z., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2008, THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS.

10- Roy, J., Pallepati, P., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2009, ACROLEIN INDUCES APOPTOSIS THROUGH THE DEATH RECEPTOR PATHWAY IN A549 CELLS: ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND p53. Manuscript soumis pour publication.

11- Roy, J., Pallepati, P., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D. 2009, ACROLEIN INDUCES A CELLULAR STRESS RESPONSE AND TRIGGERS MITOCHONDRIAL APOPTOSIS IN A549 CELLS. Manuscript soumis pour publication.

Dans la section résultats, je présenterai uniquement mes articles sur l'induction de l'apoptose par le choc thermique.

Article 1:

**THERMOTOLERANCE INDUCED AT A FEVER TEMPERATURE OF 40°C
PROTECTS CELLS AGAINST HYPERTHERMIA-INDUCED APOPTOSIS
MEDIATED BY DEATH RECEPTOR SIGNALLING**

Biochem. Cell Biol. 2008 ; 86(6)

Ahmed Bettaieb¹ and Diana A. Averill-Bates^{1,*}

¹Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec.

*Corresponding author

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000(4811); Fax: (514) 987-4647; Email: averill.diana@uqam.ca

Running head: Thermotolerance, hyperthermia and apoptosis

Keywords:

- **Hyperthermia**
- **Thermotolerance**
- **Oxidative Stress**
- **Apoptosis**
- **Death Receptor**

Total number of text figures: 13

Total number of tables: 0

Contract grant sponsor: NSERC Canada; Contract grant number: 36725-05

Résumé

Des températures relativement modérées telles que 40°C sont non létales et peuvent survenir dans des situations physiologiques ou pathologiques telle que la fièvre. Cette étude a pour objectif de déterminer si la thermotolérance induite à 40°C protégerait les cellules HeLa contre l'induction de la voie du récepteur de mort par un choc thermique léthal subséquent. Le niveau d'expression des protéines de choc thermique (Hsps) 27, 32, 60, 72, 90, et 110 a augmenté chez des cellules thermotolérantes (3 h, 40° C). Des analyses en cytométrie de flux après un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium ont révélé que la mort cellulaire survenait par apoptose (42-43°C) et par nécrose (45° C) et que la thermotolérance protège les cellules contre l'apoptose induite par un choc thermique subséquent. Nos résultats montrent aussi que l'hyperthermie létale induit l'apoptose via la voie du récepteur de mort suite à la génération des radicaux libres causant une augmentation du taux d'expression de Fas ligand et l'activation de la caspase 8. De plus, la thermotolérance a également protégé contre des événements précoces de la cascade apoptotique médiée par la voie du récepteur de mort et induits par un choc thermique subséquent léthal, entre autre la translocation de la protéine associée au domaine de mort (FADD), le clivage et l'activation de la caspase 8, ainsi que le clivage de Bid et la translocation de tBid à la mitochondrie. Des événements tardifs de la cascade apoptotique, entre autre, le clivage de PARP et ICAD ont été également régulé à la baisse chez des cellules thermotolérantes. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'hyperthermie létale induit la voie du récepteur de mort et stimule via la voie du cross-talk impliquant Bid la voie mitochondriale qui vient amplifier le signal pro-apoptotique induit par le choc thermique.

Mots-clés : Hyperthermie, Protéines du choc Thermique, Thermotolérance, Apoptose, Voie du Récepteur Fas, Caspase 8, Bid, mitochondrie.

Abstract :

Mild temperatures such as 40 °C are physiological and occur during fevers. This study determines whether mild thermotolerance induced at 40 °C can protect HeLa cells against activation of the death receptor pathway of apoptosis by lethal hyperthermia (42–45 °C). Protein expression of heat shock proteins (Hsps) 27, 32, 60, 72, 90, and 110 was increased in thermotolerant cells (3 h, 40°C). Lethal hyperthermia (42–43 °C) caused cell death by apoptosis, but at 45 °C there was a switch to necrosis. Mild thermotolerance protected cells against heat-induced apoptosis (Annexin V labelling). Hyperthermia induced apoptosis through generation of reactive oxygen species (ROS) and death receptor signalling. The antioxidant polyethylene glycol-catalase abrogated increased expression of Fas death ligand and caspase-8 activation in response to lethal hyperthermia (42–43 °C). Mild thermotolerance attenuated the heat induction of ROS and FasL, which were initiating events in death receptor activation and signalling. Mild thermotolerance inhibited early events in hyperthermia-induced death receptor apoptosis such as Fas associated death domain (FADD) translocation to membranes, caspase-8 activation, and tBid translocation to mitochondria. Downstream events in apoptosis such as caspase-3 activation, cleavage of PARP and ICAD, and chromatin condensation were also diminished in thermotolerant cells. It is important to improve knowledge about adaptive responses induced by exposure to mild stresses, such as fever temperatures, which can protect cells against subsequent exposure to lethal stress.

Keywords: Hyperthermia, Thermotolerance, Oxidative stress, Apoptosis, Death receptor,

Introduction

There is increasing interest for using clinical hyperthermia in cancer treatment, particularly in combination with existing treatments such as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy (Hildebrandt et al. 2002; van der Zee 2002). Major limitations of these treatments are lack of specificity and normal tissue toxicity. An important advantage of hyperthermia (40-45°C) is that cytotoxicity of radiotherapy and chemotherapy can be targeted to tumours, therefore decreasing toxic side effects. Furthermore, hyperthermia is among the most effective radiation sensitizers known and can eliminate radio-resistant tumour cells (Horsman et al. 2007).

Cancer cells are more vulnerable to heat injury than normal cells (Babbs et al. 1981). Higher temperatures can be achieved in tumours compared to normal tissue, due to the tumour's inability to dissipate heat. Tumours are unable to adapt their blood circulation to the effects of high temperatures, which enables hyperthermia to cut-off the supply of nutrients and oxygen, leading to lower interstitial pH and collapse in tumour vasculature (Song 1982). Cells at lower pH and decreased oxygen tension, as in centres of tumours, are more sensitive to heat-induced cytotoxicity (Wike-Hooley et al. 1984).

Randomised studies using a combination of hyperthermia with radiotherapy, chemotherapy or both, have shown significant improvement in clinical outcome for tumors of the head and neck, cervix, rectum, breast, brain, bladder, lung, oesophagus and for soft-tissue sarcoma and melanoma (Issels et al. 2006; van der Zee 2002; Van der Zee et al. 2007). Despite such promising progress with clinical hyperthermia, mechanisms involved in hyperthermia-induced cytotoxicity are still ill-defined (Milleron et al. 2007). Mild hyperthermia (38–42°C) induces expression of heat shock proteins (Hsps) and the phenomenon of thermotolerance (Calderwood et al. 2006; Field et al. 1982; Kregel 2002; Landry et al. 1989; Przybytkowski et al. 1986). However, prolonged exposure to higher temperatures (>42°C) causes cellular damage,

including protein denaturation and aggregation (Hildebrandt et al. 2002; Lepock 2004). Hyperthermia can induce cell death by apoptosis in many different cell types (Hildebrandt et al. 2002).

Apoptosis is a highly regulated mode of cell death, which occurs in response to various intracellular or extracellular signals or stresses. The main cellular signalling pathways which mediate apoptosis involve death receptors, mitochondria and endoplasmic reticulum (Lamkanfi et al. 2007). Each of these pathways results in activation of caspase proteases and a common execution phase characterized by cytoplasmic condensation, membrane blebbing and DNA fragmentation.

The death receptor pathway involves receptors, such as Fas and tumour necrosis factor (TNFR1), located at the plasma membrane of cells (Strasser et al. 1999). Receptor activation leads to translocation of procaspase-8 and a cytoplasmic adaptor protein, Fas-associated death domain (FADD), to the cytoplasmic side of the membrane, to form a death-inducing signalling complex (DISC). Caspase-8 then becomes auto-activated, leading to activation of downstream caspases-7, -6 and -3. Caspase-8 can also activate mitochondrial apoptosis through a cross-talk pathway involving cleavage of pro-apoptotic protein Bid. The truncated form tBid, then translocates to mitochondria where it can induce oligomerization and activation of pro-apoptotic protein Bax at the outer mitochondrial membrane surface, triggering apoptotic signalling through the mitochondrial pathway (Eskes et al. 2000). Translocation of Bax to mitochondria interferes with anti-apoptotic functions of proteins like Bcl-2. tBid can also homodimerize with another molecule of tBid and induce pore formation. This leads to mitochondrial membrane permeabilization (MMP), cytochrome c release and caspase activation (Strasser and Newton 1999).

The pre-exposure of cells to elevated temperatures leads to development of resistance to a subsequent lethal heat shock treatment, by a phenomenon known as thermotolerance. Thermotolerance is an adaptive cellular response which can be developed following short exposures (e.g. 30 min) to lethal temperatures (43 to 45°C),

or during continuous heating (e.g. 3 to 24h) at non-lethal temperatures (39.5 to 41.5°C) (Calderwood et al. 2006; Field and Anderson 1982; Kregel 2002; Landry et al. 1989; Przybytkowski et al. 1986). Thermotolerance can also protect cells against damage caused by other forms of stress such as oxidative stress (Martindale et al. 2002) and environmental stressors. It is transient and generally declines within several days. Earlier studies have mainly investigated the induction of thermotolerance at higher lethal temperatures, whereas induction by lower temperatures (39.5 to 41.5°C) has received little attention.

The ability of thermotolerance induced at mild temperatures to protect cells against activation of apoptosis is not well understood. Mild temperatures such as 40°C are physiological and occur during fevers. The purpose of this study is to determine whether mild thermotolerance induced at a fever temperature of 40°C can protect cells against activation of the death receptor pathway of apoptosis by lethal heat shock (42-45°C). The induction of the death receptor pathway by hyperthermia is assessed in human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells by analysing FADD translocation, caspase-8 activation and activation of the cross-talk pathway through Bid cleavage. We also consider the involvement of reactive oxygen species (ROS) in upstream activation of the death receptor pathway of apoptosis and whether pre-conditioning with mild hyperthermia can attenuate the generation of ROS by lethal heat shock.

Methods and Materials

Cell culture. HeLa cells (ATCC) were cultured as monolayers in Eagle's modified Dulbecco medium plus L-glutamine (2mM), sodium pyruvate (1mM) and 10% foetal bovine serum (Gibco Canada, Burlington, ON) (Bettaieb et al. 2005). Cells were maintained in tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Medium was replaced with fresh medium 24h before experiments. To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to an incubator for 3h at 40°C ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), following a period of 20min to allow culture medium to reach 40°C (Przybytkowski et al. 1986). Cells were harvested using 0.5mg/ml trypsin/0.2mg/ml EDTA in phosphate-buffered saline and washed by centrifugation (1000g, 3min). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3h (trypan blue exclusion).

Heat treatment. Freshly harvested thermotolerant (3h at 40°C) and non-thermotolerant cells were heated for 1 and 2h at 42-45°C, relative to controls (37°C), in temperature-controlled waterbaths ($\pm 0.02^\circ\text{C}$) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC). Under these conditions, 1ml of cell suspension reached a temperature within 0.1°C of the waterbath temperature within 3min. The time for hyperthermia treatment was calculated after the 3min heating period. Where indicated, cells were pretreated with a Fas antagonist Kp7-6 (1mM, 1h), or with inhibitors of caspase-10 (Z-AEVD-FMK) (20µM, 2h) (BioVision, Mountain view, CA), caspase-8 (Z-IETD-FMK) (Calbiochem) (20µM, 2h) or caspase-2 (Z-VDVAD-FMK) (25µM, 1h) (Calbiochem, La Jolla, CA).

Immunodetection of total protein expression. Cells were lysed (Bettaieb and Averill-Bates 2005) and proteins (30µg) (Bradford 1976) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli 1970) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bettaieb and Averill-Bates 2005), which were probed with the

primary antibodies (1:1000): Hsp27, HO-1/HO-2, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110 (Stressgen, Victoria, BC, Canada), c-FLIP, polyADP-ribose polymerase (PARP), inhibitor of caspase activated DNase (ICAD), caspase-3, caspase-9, caspase-8, β -actin or GAPDH (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Secondary antibodies (1:5000) were goat horse-radish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal anti-mouse IgG or HRP-conjugated rat MAb-anti-rabbit IgG (Biosource, Camarillo, CA). Membranes were incubated in ECL-Plus chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) and films were scanned with a Laser Scanning Densitometer (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA). Total protein expression was analysed using IPGEL software and normalized to GAPDH as loading control.

Immunodetection of proteins in subcellular fractions. Subcellular fractionation was performed as described previously (Samali et al. 1999). Subcellular distribution of proteins (FADD, Bax, Bid/tBid and cytochrome c; 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) was analyzed by immunoblotting 30 μ g of protein samples (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Purity of microsomal, cytoplasmic and mitochondrial fractions was verified using antibodies to calnexin, GST π 1 (Calbiochem) and cytochrome c oxidase, respectively (Molecular Probes, Eugene, OR).

Immunoprecipitation. Following heat treatment, cell lysates were prepared by extraction with cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate and 1% Triton-X, pH 7.5) supplemented with protease inhibitors for 30 min at 4°C. Debris was removed from lysates by centrifugation at 15,000g for 10 min. For immunoprecipitation (Harlow 1999), lysates were incubated with 50 μ l of protein A-agarose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) pre-coated with rabbit anti-Fas polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for 2h at 4°C. The beads were washed three

times with RIPA buffer and the appropriate proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE and Western blotting.

Annexin V staining. Cells were labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V (BD Pharmingen, San Diego, CA) and propidium iodide (PI) (Averill-Bates et al. 2005). Cells (10,000) were analyzed using a FACScan equipped with an argon laser (488 nm) (Becton Dickinson, San Jose, CA). Intensities of fluorescence emitted by annexin V-FITC (530 nm) and PI (585 nm) were collected on FL1 and FL3 channels, respectively. Viable cells are negative for annexin V and PI staining. The percentage of annexin V-stained cells was quantified using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Caspase activity. Cell lysates were prepared (Stennicke et al. 1997) and incubated with caspase substrates (Bettaieb and Averill-Bates 2005) (50 μ M): Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methyl-coumarin (Ac-DEVD-AMC) for caspase-3, Z-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin (Z-IETD-AFC) for caspase-8, Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC (Ac-LEHD-AFC) for caspase-9, N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (Ac-IETD-AFC) for caspase-10 and Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC (Z-VDVAD-AFC) for caspase-2 (Calbiochem). Substrate cleavage to generate AFC and AMC was measured by spectrofluorimetry (SpectraMax Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at appropriate excitation and emission wavelengths. Caspase activities are represented as V_{max} of the kinetic reaction.

Fas ligand (FasL) expression. Cells were fixed with 1% formaldehyde for 20 min and permeabilized with saponin buffer (20mM Hepes/138mM KCl/4mM $MgCl_2$ /0.2mg/ml saponin/1% bovine serum albumin/1mM ATP/3mM phalloidin) for 1min. Cells were washed twice in saponin-free buffer, and labelled for 1h with 20 μ g/ml of R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human CD95 monoclonal

antibody (Caltag laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence intensity for 10,000 cells was analyzed by FACScan.

Morphological analysis of apoptosis. Cells were labelled with Hoechst 33258 (50 μ g/ml) (blue-green fluorescence) (Sigma), which binds to condensed nuclear chromatin of apoptotic cells (Bettaieb and Averill-Bates 2005). PI (50 μ g/ml) was subsequently added to visualize necrotic cells (red fluorescence) by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC). For each condition, at least 300 cells were counted. Fractions of apoptotic or necrotic cells were calculated relative to total cells using Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

ROS generation. The generation of pro-oxidants was measured as described previously (Denning et al. 2002), with modifications. Cells were pretreated or not with 300 μ M polyethylene glycol catalase (PEG-catalase) for 3h and then exposed to heat shock for 2h. Ten μ M of 2'7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) was then added. H₂DCF-DA produces a green fluorescence when it becomes oxidized in the presence of ROS. Levels of ROS in 10,000 cells were determined by flow cytometry (Ex: 488 nm) using FL-1 (Em: 515 nm) channel.

Statistics. Data represent means \pm SEM from at least 3 independent experiments. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups (comparison of curves for thermotolerant versus non-thermotolerant cells; cells \pm Kp7-6 or caspase-8 inhibitor) were made by one-way analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level (α =5%). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). For significant differences, $P < 0.05$.

Results

Induction of Hsps by mild thermotolerance developed at 40°C. The development of thermotolerance at lethal temperatures, such as 43-45°C, is usually linked to induction of Hsps. We therefore determined whether induction of thermotolerance by heating at a mild temperature of 40°C for 3 h could increase the expression of six HSPs in HeLa cells (Figure 1). Indeed, the protein expression of Hsps 27, 32, 60, 72, 90 and 110 was significantly increased by 30 to 80% in thermotolerant HeLa cells (3h, 40°C), compared to controls (3h, 37°C) (Figure 1). There was no significant change in the expression of these HSPs in cells that were incubated at 37°C for 3 h.

Mild thermotolerance protects cells against hyperthermia-induced phosphatidylserine (PS) externalization. Subsequently, the ability of mild thermotolerance induced at 40°C to protect cells against activation of apoptosis by lethal heat shock was investigated. Cells were heated (42-45°C, 2h) and then assessed for induction of apoptosis by annexin V-FITC binding to externalized PS on cell membranes. Hyperthermia caused an increase in annexin V-labelled cells, compared to controls at 37°C (Figure 2A-2D). When thermotolerant cells were exposed to lethal temperatures (42-45°C), PS externalization was significantly decreased ($P<0.05$), compared to non-thermotolerant cells (Figure 2E-2H). These results show that mild thermotolerance protects cells against hyperthermia-induced apoptosis.

Protective effect of mild thermotolerance against heat-induced apoptotic signalling through the death receptor pathway. We subsequently investigated the mechanisms involved in the protective effect of mild thermotolerance against heat-induced apoptosis, by looking at activation of the death receptor pathway. First of all, the translocation of adaptor protein FADD (Figure 3) and activation of caspase-8 (Figure 4) were investigated. Hyperthermia (42-45°C) caused FADD translocation from the cytosol (Figs. 3A-3B) to the cell membrane (Figs. 3C-3D) after 1h (data not

shown) and 2h, compared to control cells at 37°C. Immunoprecipitation experiments revealed that hyperthermia (42-45°C) induced formation of a complex between Fas receptor, FADD and procaspase-8 (Figure 3E). In thermotolerant cells, FADD translocation ($P<0.05$) was significantly reduced at 42 to 45°C, compared to non-thermotolerant cells (Figs. 3A-3D). It is possible that mild thermotolerance could provide protection against hyperthermia-stimulated apoptosis by inducing the expression of other cellular defense proteins, in addition to Hsps. However, expression of the anti-apoptotic protein c-FLIP did not change in thermotolerant cells and was not affected by heat (Figure 3F).

Hyperthermia (42-45°C) caused procaspase-8 cleavage (p55) and an increase in the p20 cleavage fragment (Figs. 4A-4C). Activation of caspase-8 by hyperthermia (42-43°C) was confirmed by an enzymatic assay and was significantly attenuated by a caspase-8 inhibitor ($P<0.001$) (Figure 4D). Mild thermotolerance afforded a significant protective effect against heat-induced caspase-8 activation and procaspase-8 cleavage at 42 to 45°C ($P<0.05$), compared to non-thermotolerant cells (Figs. 4A-4D). We investigated whether mild thermotolerance could inhibit the activation of other initiator caspases by hyperthermia. Indeed, caspases-2 and -10 were activated at 43°C, with low activation at 42°C and 45°C (Figs. 4E-4F). Their activation was attenuated by their respective inhibitors. Mild thermotolerance completely blocked activation of caspase-10 and caused pronounced inhibition of caspase-2 activation. Together these findings show that mild thermotolerance protects HeLa cells against early events in hyperthermia-induced apoptosis mediated by the death receptor.

Role of Fas death receptor in heat shock-induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerance. Apoptosis can be mediated by several different death receptors. The next step was to determine whether death receptor activation by hyperthermia was dependent on Fas signalling. Indeed, HeLa cells express Fas

receptor and expression was not affected by elevated temperatures (42-45°C) (Figure 5A). However, hyperthermia (42-45°C) caused an increase in expression of the death ligand FasL (Figure 5B). In mild thermotolerant cells, there was a complete inhibition of FasL induction ($P<0.05$) (Figure 5B), while expression of Fas was unaffected (Figure 5A).

To further confirm the role of Fas, we determined whether inhibition of Fas activation could block hyperthermia-induced apoptosis. Kp7-6 is an effective Fas/FasL antagonist. It is an irreversible inhibitor of Fas activation, which acts by preventing Fas ligand from forming a stable complex with the Fas receptor (Hasegawa et al. 2004). Pre-treatment with Kp7-6 significantly reduced heat-induced FADD membrane translocation (Figure 3A-3D), procaspase-8 cleavage (Figure 4A-4C) and caspase-8 activation ($P<0.05$) (Figure 4D). Together, these findings suggest that hyperthermia activates death receptor signalling of apoptosis through Fas. Mild thermotolerance inhibited the heat induction of FasL, which is an initiating event in death receptor activation and signalling.

Mild thermotolerance inhibits hyperthermia-induced activation of the cross-talk pathway. Hyperthermia (42-45°C) caused cleavage of cytosolic Bid (Figure 6A-6B), while levels of tBid increased in mitochondrial fractions (Figure 6A,6C). Mild thermotolerance induced at 40°C afforded significant protection against heat-induced Bid cleavage and tBid translocation ($P<0.05$). The partial inhibition of hyperthermia-induced Bid cleavage and tBid translocation by Kp7-6 ($P<0.05$) and a caspase-8 inhibitor (Bid, $P<0.05$; tBid, $P<0.001$) (Figs. 6A-6C) suggested that these events were mediated in part, by Fas signalling and caspase-8 activation. These findings suggest that alternative mechanisms, which could be mediated by other receptors and/or caspases, could also be involved in Bid cleavage during hyperthermia-induced apoptosis in HeLa cells.

Mild thermotolerance affords protection against hyperthermia induced Bax translocation and apoptotic signalling through the mitochondrial pathway. We therefore determined whether mild thermotolerance could inhibit hyperthermia-induced apoptotic signalling through the mitochondrial pathway. Hyperthermia (42-45°C) caused Bax translocation from the cytosol (data not shown) to mitochondria (Figure 7A-7B), and cytochrome c release from mitochondria (data not shown) into the cytosol (Figs. 8A-8B). Hyperthermia (42-45°C) also caused a decrease in procaspase-9 expression (Figs. 9A-9B) and increased enzymatic activity of caspase-9 (Figure 9C). Indeed, all of these mitochondrial events were significantly decreased in thermotolerant cells that were heated at lethal temperatures of 42 to 45°C (Figs. 7, 8 & 9).

Furthermore, Kp7-6 and caspase-8 inhibition partially decreased Bax translocation (Figure 7), cytochrome c release (Figure 8) and caspase-9 activation (Figure 9). Together, these findings suggest that apoptotic signalling through the mitochondrial pathway was at least in part, mediated through Fas and caspase-8. The lack of total inhibition of mitochondrial signalling events by Kp7-6 and caspase-8 inhibition suggests that hyperthermia can also activate the mitochondrial pathway directly or by other mechanisms, which are independent of the death receptor pathway.

Mild thermotolerance protects against activation of the execution phase of apoptosis by hyperthermia. The next step was to determine whether mild thermotolerance could inhibit activation of the execution phase of apoptosis, which involves caspase-3 activation, cleavage of caspase substrates and nuclear changes that are common to the death receptor and mitochondrial signalling pathways. Hyperthermia caused procaspase-3 cleavage (Figs. 9D-9E) and increased caspase-3 activity (42-43°C) (Figure 9F). The decrease in caspase-3 activity at 45°C is probably explained by inhibition of enzymatic activity and/or the increasing level of cell death

by necrosis at this higher temperature (Figure 11F). Furthermore, hyperthermia (42-45°C) induced cleavage of caspase substrates PARP (Figs. 10A-10C) and ICAD (Figs. 10D-10E). Mild thermotolerance led to significant and pronounced inhibition of caspase-3 activation ($P<0.001$), and cleavage of PARP and ICAD ($P<0.05$) in response to lethal heat shock. These downstream events were also inhibited by Kp7-6 and by caspase-8 inhibition.

Hyperthermia (42-45°C) caused nuclear chromatin condensation and cell death by necrosis (Figs. 11A1-11A4, 11E, 11F). Mild thermotolerance significantly decreased the percentage of apoptotic cells ($P<0.001$) (Figs. 11B1-11B4, 11E). Levels of necrosis were similar in thermotolerant and non-thermotolerant cells (Figure 11F), suggesting that thermotolerance only protects against apoptotic cell death and not necrosis. In addition, heat-induced chromatin condensation was decreased by Kp7-6 ($P<0.01$) (Figs. 11C1-11C4, 11E). In HeLa cells, hyperthermia (42-43°C, 1-2h) activated caspase-8, caspase-2 and caspase-10 (Figure 4). However, pharmacological inhibition of caspase-8 significantly ($P<0.001$) reduced nuclear chromatin condensation (Figs. 11D1-11D4, 11E), whereas inhibition of caspases-2 and -10 had no effect (Figure 11E), suggesting that hyperthermia-induced apoptosis is mediated by caspase-8 in HeLa cells. However, there was a partial decrease in hyperthermia-induced necrosis by caspase-8 inhibition (Figure 11F).

Heat shock induces ROS generation, which mediates death receptor activation: attenuation by mild thermotolerance. The subsequent step was to evaluate whether ROS could mediate hyperthermia induced activation of Fas receptor signalling. In fact, ROS have been shown to induce death ligands such as Fas and TNF- α (Petak et al. 2001). Furthermore, findings from several studies suggest that hyperthermia can increase oxidative stress (Flanagan et al. 1998; Li et al. 1997; Lord-Fontaine et al. 2002; Lord-Fontaine et al. 1999). Indeed, there was a marked increase in DCF-detectable pro-oxidant production at 42 to 45°C, which was significantly inhibited by

the antioxidant PEG-catalase ($P < 0.05$) (Figure 12A). PEG-catalase is cell-permeable and able to detoxify peroxides both inside and outside the cell (Lord-Fontaine and Averill 1999). Interestingly, hyperthermia-induced ROS generation was inhibited by mild thermotolerance ($P < 0.05$) (Figure 12A).

To address the role of ROS in heat shock-induced death receptor signalling, the ability of the antioxidant PEG-catalase to inhibit activation of Fas was determined. Indeed, PEG-catalase significantly diminished induction of FasL expression at 42 to 43°C ($P < 0.05$), but not at 45°C (Fig 12B). PEG-catalase also significantly reduced hyperthermia-induced caspase-8 activation at 42 to 45°C ($P < 0.05$) (Fig 12C). Furthermore, PEG-catalase partially reduced heat-induced chromatin condensation (data not shown). These findings show that hyperthermia increases ROS generation, which mediates activation of apoptosis via the death receptor pathway. Mild thermotolerance developed at 40°C inhibited initiating events as well as downstream events in hyperthermia-induced apoptosis.

Discussion

Role of ROS in hyperthermia-induced apoptosis. This study demonstrates that exposure to hyperthermia (42-43°C) for 1 to 2h induces apoptosis through the death receptor pathway in human tumor cells. At 45°C, there was a switch from apoptotic to necrotic cell death. Our findings suggest that upstream activation of the death receptor pathway of apoptosis, in response to hyperthermia, is mediated by ROS generation. This was confirmed by a heat-induced increase in ROS generation, as well as inhibition of FasL induction and caspase-8 activation by the antioxidant PEG-catalase. The origin of hyperthermia-induced ROS, however, remains to be identified. A likely source is mitochondria, where the major intracellular source of ROS is the respiratory chain (Ott et al. 2007). Since reaction rates are increased at elevated temperatures, hyperthermia is likely to increase the formation of superoxide by the mitochondrial electron transport chain. Superoxide is subsequently converted to hydrogen peroxide, which is able to diffuse out of mitochondria. Other potential intracellular sources of heat-derived ROS include NADPH oxidase and xanthine oxidase, whose activities were increased by 44°C hyperthermia in HaCaT keratinocytes (Shin et al. 2008).

The relationship between death receptor signalling and ROS metabolism is not clearly defined and responses are often cell type dependent. ROS have been shown to upregulate FasL and/or Fas in several cell types (Denning et al. 2002; Devadas et al. 2003; Kwon et al. 2001; Petak and Houghton 2001). Another likely mechanism is that increased ROS production can promote activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway (Nakano et al. 2006; Tobiume et al. 2001). This appears to involve inhibition of mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphatases (MKPs), which are enzymes involved in the inactivation of JNK and other MAPKs (Kamata et al. 2005). The catalytic cysteine of MKPs is very sensitive to ROS-induced oxidation, resulting in inhibition of MKP activity, which leads to sustained activation of JNK. It was reported that exogenous addition of FasL led to increased ROS generation in

lung epithelial cells (Wang et al. 2008). ROS regulated apoptosis through down-regulation of FLIP, a suppressor of Fas death receptor signalling, in these cells. In HeLa cells, hyperthermia increased ROS generation, which induced FasL expression, but there was no change in FLIP expression.

Protective effects of thermotolerance developed at non-lethal, fever temperatures against hyperthermia-induced apoptosis. The induction of thermotolerance at mild, fever-range temperatures such as 39-40°C has received little attention. Fever-range whole-body hyperthermia (39.5-40°C, 6h) treatment of BALB/c mice in vivo led to increased expression of Hsp70 and Hsp110 in several tissues (Ostberg et al. 2002). Our findings show that mild thermotolerance induced at 40°C inhibited death receptor-mediated apoptosis caused by lethal heat shock (42-43°C) in HeLa cells. Mild thermotolerance increased synthesis of Hsps 27, 32, 60, 70, 90 and 110, which could be involved in protection against apoptosis. Overexpression of different HSPs has been shown to induce a survival response. Mild thermotolerance also inhibited hyperthermia-induced ROS generation. This could be attributed to the ROS-inhibitory effect of Hsps such as Hsp27 and Hsp70 in thermotolerant cells, both of which are known to inhibit oxidative stress (Beere 2005; Huot et al. 1996). In addition, overexpression of Hsp27 can inhibit oxidative stress-induced cellular damage by increasing levels of cellular glutathione (McCollum et al. 2006; Mehlen et al. 1996). Together, these findings support a role for Hsps as important regulators of death receptor signalling induced by hyperthermia in human carcinoma cells.

Thermotolerance developed at mild temperatures could also protect cells against other apoptotic-inducing stimuli. Indeed, thermotolerance developed by non-lethal heat shock (30 min, 42°C) protected human lymphocytes against apoptosis induced at 44°C and by low dose radiation (0.05 Gy) (Boreham et al. 1997). An interesting point was that both heat and radiation induced variable levels of apoptosis in lymphocytes

from different human donors. The broader physiological importance of this study concerns the need to improve knowledge about adaptive responses induced in cells by exposure to mild stresses, such as fever temperatures, oxidative stress, low dose radiation and toxic drugs, etc, which can in turn, provide protection against subsequent exposure to lethal stress induced by a variety of stimuli.

Protective effects of Hsps against stress-induced apoptosis. Hsp27, Hsp32, Hsp70, Hsp90 and Hsp110 have been implicated in protection against apoptosis induced by different stresses, including chemotherapeutic agents, UV radiation, reactive oxygen species, death receptor ligation and heat shock (Beere 2005; Buzzard et al. 1998; Huot et al. 1996; Mosser et al. 1997). For the extrinsic pathway, Hsps can regulate Fas-, TNFR, and TRAIL-dependent pathways of apoptosis, although underlying mechanisms are ill-defined. Hsp27 and Hsp70 can modulate Bid-dependent apoptosis (Gabai et al. 2002; Paul et al. 2002). Hsp70 inhibited TNF-induced release of cytochrome c by suppressing caspase-8-mediated Bid cleavage in human lung fibroblasts (Gabai et al. 2002). Hsp27 can prevent Bid translocation to mitochondria (Beere 2005), and Fas-induced caspase-independent apoptosis through a direct interaction with Daxx (Charette et al. 2000). For the intrinsic pathway, Hsp70 and Hsp90 can interfere with apoptosome formation, thereby preventing caspase-9 activation (Beere 2005; Pandey et al. 2000; Pandey et al. 2000). Hsp72 can block cytochrome c release from mitochondria and MMP (Steel et al. 2004). Suppression of apoptosis by Hsp70 may be a direct consequence of its ability to negatively regulate c-jun N-terminal kinase (JNK) signalling events (Buzzard et al. 1998; Mosser et al. 1997). Hsp60, however, has an unusual role since it can exert both pro-apoptotic and anti-apoptotic functions (Deocaris et al. 2006). Therefore, Hsps have a complex role in regulation of apoptosis and further investigations are needed to improve understanding of their precise cellular protective mechanisms against thermal and other stresses.

Induction of apoptosis by hyperthermia. The induction of apoptosis by hyperthermia (42-44°C) has been reported in several different cell types and can occur through both the intrinsic and extrinsic pathways. However, molecular signalling mechanisms involved in hyperthermia-induced apoptosis remain unclear and can vary between different cell types. Heat can alter mitochondrial membrane permeability and cause cytochrome c release in human tumor cells (Bettaieb and Averill-Bates 2005) and in mitochondria isolated from rat cardiomyocytes (Qian et al. 2004). Hyperthermia (43°C) increased levels of the death ligands TRAIL and Fas-L, as well as caspase-8, in H-ras-transfected human bronchial epithelial (BZR-T33) cells (Vertrees et al. 2005). In mouse embryonic fibroblasts (MEF) and Jurkat T cells, caspase-2 mediated apoptosis induced by heat shock (43-44°C, 1h) upstream of mitochondria through Bid cleavage (Bonzon et al. 2006; Tu et al. 2006). However, apoptosis in heated (45°C, 2h) human Jurkat T cells did not involve caspase-2 or caspase-8 (Milleron et al. 2006).[‡]

In HeLa cells, hyperthermia (42-43°C) appears to induce apoptosis by signalling events involving both death receptor and mitochondrial pathways (Scheme 1). Our findings suggest that heat shock-induced apoptosis was mediated through the Fas receptor, since hyperthermia-induced FADD translocation and caspase-8 activation were inhibited by the Fas/FasL antagonist, Kp7-6 (Scheme 1). Kp7-6 is a small exocyclic cystine-knot peptide mimetic that binds to both Fas and FasL and modifies their apoptotic signalling by disabling receptor ensembles (Hasegawa et al. 2004). The cystine-knot loop structure in Kp7-6 was originally derived from a region of Fas receptor that is important for binding of Fas to FasL. Kp7-6 does not bind to TNF- α or to the closely related TNFRs (Hasegawa et al. 2004). The inhibitory effects of Kp7-6 demonstrated that Bid cleavage, translocation of tBid and Bax to mitochondria, and activation of the mitochondrial pathway can occur downstream of Fas. However, Kp7-6 and the caspase-8 inhibitor caused only partial inhibition of the mitochondrial

pathway, indicating that this apoptotic pathway can also be activated directly by hyperthermia, probably as a stress response, as well as through death receptor signalling.

Clinical relevance of fever range temperatures. Mild fever-range temperatures, that can activate the heat shock response, are also beneficial to a wide variety of organisms during infection (Hasday et al. 2000). Cancer patients undergoing high-dose chemotherapy often experience fevers, particularly during periods of neutrophil depletion. It is not known whether these febrile temperatures could enhance cytotoxic effects of chemotherapy and radiotherapy in cancer patients, or on the contrary, could induce thermotolerance and Hsps, which may attenuate tumour responses to these treatments. Interestingly, a large fraction of spontaneous regressions and remissions has been observed in cancer patients following feverish infection (Hobohm 2005). There is thus renewed interest that clinically-controlled induction of fever could have therapeutic value. Therefore, improved understanding of signalling cascades involved in cell death pathways induced by the heat shock response has considerable relevance for developing new therapeutic options for killing tumour cells (e.g. fever therapy), preventing cell death in neurodegenerative diseases and treating infections.

Acknowledgments

The authors thank Bertand Fournier for statistical analysis.

References

Averill-Bates, D.A., Cherif, A., Agostinelli, E., Tanel, A., and Fortier, G. 2005. Anti-tumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model. *Biochem Pharmacol* **69**(12):1693-1704.

Babbs, C.F., and DeWitt, D.P. 1981. Physical principles of local heat therapy for cancer. *Med Instrum* **15**(6):367-373.

Beere, H.M. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* **115**(10):2633-2639.

Bettaieb, A., and Averill-Bates, D.A. 2005. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **205**(1):47-57.

Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. 2006. Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell* **17**(5):2150-2157.

Boreham, D.R., Dolling, J.A., Maves, S.R., Miller, S., Morrison, D.P., and Mitchel, R.E. 1997. Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes. *Biochem Cell Biol* **75**(4):393-397.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

Buzzard, K.A., Giaccia, A.J., Killender, M., and Anderson, R.L. 1998. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**(27):17147-17153.

Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., and Ciocca, D.R. 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* **31**(3):164-172.

- Charette, S.J., and Landry, J. 2000. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **926**(126-131).
- Denning, T.L., Takaishi, H., Crowe, S.E., Boldogh, I., Jevnikar, A., and Ernst, P.B. 2002. Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **33**(12):1641-1650.
- Deocaris, C.C., Kaul, S.C., and Wadhwa, R. 2006. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* **11**(2):116-128.
- Devadas, S., Hinshaw, J.A., Zaritskaya, L., and Williams, M.S. 2003. Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis. *Free Radic Biol Med* **35**(6):648-661.
- Esques, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**(3):929-935.
- Field, S.B., and Anderson, R.L. 1982. Thermotolerance: a review of observations and possible mechanisms. *Natl Cancer Inst Monogr* **61**(193-201).
- Iley, P.L., and Buettner, G.R. 1998. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett* **431**(2):285-286.
- Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D., and Sherman, M.Y. 2002. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(10):3415-3424.
- Harlow, E., and Lane D. 1999. *Using Antibodies*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hasday, J.D., and Singh, I.S. 2000. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress Chaperones* **5**(5):471-480.

Hasegawa, A., Cheng, X., Kajino, K., Berezov, A., Murata, K., Nakayama, T., Yagita, H., Murali, R., and Greene, M.I. 2004. Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17):6599-6604.

Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., and Riess, H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* **43**(1):33-56.

Hobohm, U. 2005. Fever therapy revisited. *Br J Cancer* **92**(3):421-425.

Horsman, M.R., and Overgaard, J. 2007. Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**(6):418-426.

Huot, J., Houle, F., Spitz, D.R., and Landry, J. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* **56**(2):273-279.

Issels, R.D., Schlemmer, M., and Lindner, L.H. 2006. The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma. *Curr Oncol Rep* **8**(4):305-309.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**(5):649-661.

Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* **92**(5):2177-2186.

Kwon, D., Choi, C., Lee, J., Kim, K.O., Kim, J.D., Kim, S.J., and Choi, I.H. 2001. Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis. *J Neuroimmunol* **113**(1):1-9.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* **14**(1):44-55.
- Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E., and Weber, L.A. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* **109**(1):7-15.
- Lepock, J.R. 2004. Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization. *Int J Hyperthermia* **20**(2):115-130.
- Li, J.J., and Oberley, L.W. 1997. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia. *Cancer Res* **57**(10):1991-1998.
- Lord-Fontaine, S., and Averill-Bates, D.A. 2002. Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med* **32**(8):752-765.
- Lord-Fontaine, S., and Averill, D.A. 1999. Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses. *Arch Biochem Biophys* **363**(2):283-295.
- Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**(1):1-15.
- McCollum, A.K., Teneyck, C.J., Sauer, B.M., Toft, D.O., and Erlichman, C. 2006. Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism. *Cancer Res* **66**(22):10967-10975.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., and Arrigo, A.P. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* **271**(28):16510-16514.

- Milleron, R.S., and Bratton, S.B. 2006. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *J Biol Chem* **281**(25):16991-17000.
- Milleron, R.S., and Bratton, S.B. 2007. 'Heated' Debates in Apoptosis. *Cell Mol Life Sci*
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C., and Massie, B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**(9):5317-5327.
- Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J.H., Xue, X., and Okumura, K. 2006. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* **13**(5):730-737.
- Ostberg, J.R., Kaplan, K.C., and Repasky, E.A. 2002. Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **18**(6):552-562.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**(5):913-922.
- Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D., and Kharbanda, S. 2000. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* **19**(16):1975-1981.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., and Kharbanda, S. 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* **19**(16):4310-4322.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S., and Arrigo, A.P. 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* **22**(3):816-834.

Petak, I., and Houghton, J.A. 2001. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res* **7**(2):95-106.

Przybytkowski, E., Bates, J.H., Bates, D.A., and Mackillop, W.J. 1986. Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiat Res* **107**(3):317-331.

Qian, L., Song, X., Ren, H., Gong, J., and Cheng, S. 2004. Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones* **9**(3):281-293.

Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., and Orrenius, S. 1999. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* **18**(8):2040-2048.

Shin, M.H., Moon, Y.J., Seo, J.E., Lee, Y., Kim, K.H., and Chung, J.H. 2008. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med* **44**(4):635-645.

Song, C.W. 1982. Physiological factors in hyperthermia. *Natl Cancer Inst Monogr* **61**:169-176.

Steel, R., Doherty, J.P., Buzzard, K., Clemons, N., Hawkins, C.J., and Anderson, R.L. 2004. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem* **279**(49):51490-51499.

Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. 1997. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* **272**(41):25719-25723.

Strasser, A., and Newton, K. 1999. FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(5):533-537.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. 2001. ASK1 is required for

sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* **2**(3):222-228.

Tu, S., McStay, G.P., Boucher, L.M., Mak, T., Beere, H.M., and Green, D.R. 2006. In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**(1):72-77.

van der Zee, J. 2002. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol* **13**(8):1173-1184.

Van der Zee, J., and Erasmus, M.C. 2007. Hyperthermia in addition to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**(3 Suppl):S18.

Vertrees, R.A., Das, G.C., Coscio, A.M., Xie, J., Zwischenberger, J.B., and Boor, P.J. 2005. A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells. *Mol Carcinog* **44**(2):111-121.

Wang, L., Azad, N., Kongkaneramt, L., Chen, F., Lu, Y., Jiang, B.H., and Rojanasakul, Y. 2008. The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *J Immunol* **180**(5):3072-3080.

Wike-Hooley, J.L., Van der Zee, J., van Rhoon, G.C., Van den Berg, A.P., and Reinhold, H.S. 1984. Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* **20**(5):619-623.

Figure Legends

Figure 1: Induction of Hsps by mild heat shock at 40°C. HeLa cells were heated at 37 or 40°C for 3h. Western blots of Hsps are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 2: Thermotolerance at 40°C protects cells against hyperthermia-induced externalization of phosphatidylserine. Thermotolerant (3h, 40°C) (E-H) and normal, non-thermotolerant (3h, 37°C) (A-D) cells were heated for 2h at 42-45°C, and then labelled with annexin V-FITC (FL1 channel) and PI (FL3 channel). Data for annexin V-positive cells represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For significant differences between hyperthermia-treated (42-45°C) cells and the non-thermotolerant control (37°C), $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**).

Figure 3: Mild thermotolerance protects cells against hyperthermia-induced FADD translocation. Following heat shock (42-45°C) for 1h (data not shown) or 2h, with or without Fas antagonist (Kp7-6), FADD protein was immunodetected and analysed by densitometry in cytosolic (A,B) and microsomal (C,D) fractions. Blots are representative of four independent experiments. FADD expression in thermotolerant (■) and non-thermotolerant cells, with (◼) or without Kp7-6 (□), is relative to non-thermotolerant controls at 37°C (100%). (E) Cells were subjected to immunoprecipitation using anti-Fas antibody and FADD and procaspase-8 were detected by Western blotting. As a positive control (PC), 20 μ g of whole-cell extract from normal HeLa cells was used. (F) Expression of c-FLIP was immunodetected in cell lysates. (G) Purity of microsomal, cytosolic and mitochondrial fractions was confirmed using calnexin, GST π , and cytochrome c oxidase antibodies, respectively. For significant differences between heated (42-45°C) cells and the non-thermotolerant control (37°C), $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). For analysis of curves

between non-thermotolerant and thermotolerant cells in cytoplasmic and microsomal fractions, $P<0.001$ and $P<0.05$, respectively.

Figure 4: Thermotolerance at 40°C inhibits heat shock-induced caspase-8 activation. Thermotolerant (■) (3h, 40°C) and non-thermotolerant cells, with Fas antagonist (⊠) or caspase-8 inhibitor (■) or no inhibitor (□), were heated (42-45°C) for 2h. Immunoblots for caspase-8 in cell lysates are representative of four independent experiments (A). Levels of procaspase-8 (p55) (B) and p20 cleavage fragment (C) were analyzed by densitometry and expressed relative to non-thermotolerant control cells at 37°C (100%). Activities of caspase-8 (D), caspase-10 (E) and caspase-2 (F) in thermotolerant (●) and non-thermotolerant cells, with Kp7-6 (□), or an appropriate caspase inhibitor (○), were expressed relative to non-thermotolerant cells at 37°C (■), designated as 1.0. The inset for Figure 3D shows caspase-8 activation after 1h. Data represent means±SEM from five independent experiments. (D-F) For significant differences for caspase activities between heat-treated cells and untreated controls (37°C), $P<0.05$ (*) and $P<0.001$ (**).

Figure 5: Hyperthermia increases Fas ligand expression; abrogation by mild thermotolerance. Thermotolerant (■) and non-thermotolerant (□) cells were heated (42-45°C) for 2h. Fas expression was measured by immunodetection (A). Means and SEM for levels of expression of Fas ligand protein (B) were determined by flow cytometry (N=4). For significant differences between heat-treated cells and untreated controls (37°C), $P<0.05$ (*).

Figure 6: Heat shock causes Bid cleavage: protection by thermotolerance at 40°C. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (42-45°C) for 2h. (A) Representative immunoblots are shown for Bid (21kDa) in the cytosol and tBid (14kDa) in mitochondria. Means and SEM from densitometric analysis of five

independent experiments, with two estimations per point, are shown for Bid and tBid in thermotolerant (■) and non-thermotolerant cells, either with Fas antagonist (◩) or caspase-8 inhibitor (◪), and are expressed relative to non-thermotolerant control cells at 37°C (□) (B,C). Significant differences between heated cells and untreated controls (37°C) are represented by $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

Figure 7: Thermotolerance at 40°C inhibits hyperthermia-induced Bax translocation to mitochondria. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (42-45°C) for 1h. (A, B) Representative immunoblots and densitometric analysis are shown for Bax (21kDa) levels in mitochondrial fractions. Bax expression in thermotolerant (■) and non-thermotolerant cells, with Kp7-6 (◩) or caspase-8 inhibitor (◪), is relative to non-thermotolerant control cells (37°C) (□). Means and SEM are from 5 independent experiments. For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**). For analysis of curves for non-thermotolerant versus thermotolerant cells, $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively.

Figure 8: Mild thermotolerance inhibits heat shock-induced cytochrome c release. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (42-45°C) for 1h. Representative immunoblots (A) and densitometric analysis (B) are shown for cytochrome c levels (13kDa) in cytosolic fractions in thermotolerant (■) and non-thermotolerant cells, with Fas antagonist (◩) or caspase-8 inhibitor (◪). Data from 5 independent experiments are expressed relative to non-thermotolerant control cells at 37°C (□). For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), $P < 0.05$ (*). For analysis of curves for non-thermotolerant versus thermotolerant cells in cytosolic and mitochondrial fractions, $P < 0.05$. For analysis of curves for non-thermotolerant cells \pm Kp7-6 or \pm caspase-8 inhibitor, for cytochrome c in mitochondrial fractions, $P < 0.05$.

Figure 9: Hyperthermia activates caspases-9 and -3: inhibitory effect of mild thermotolerance. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (42-45°C) for 2h. Representative immunoblots and densitometric analysis for cleavage of procaspase-9 (A,B) and procaspase-3 (D,E) in whole cell lysates are from at least four independent experiments. Expression of procaspases is relative to control cells at 37°C (100%). Activities of caspases-9 (C) and -3 (F) in thermotolerant (●) and non-thermotolerant (3h, 37°C) cells, with Kp7-6 (□) or caspase-8 inhibitor (○), were expressed relative to non-thermotolerant cells at 37°C (■), designated as 1.0. For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

Figure 10: Thermotolerance decreases hyperthermia-induced cleavage of PARP and ICAD. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (42-45°C) for 2h. Representative immunoblots and densitometric analysis are shown for levels of (A-C) PARP (116kDa) and its 86kDa cleavage fragment, and (D,E) ICAD (45kDa). Protein expression in thermotolerant (■) and non-thermotolerant cells, with Fas antagonist (■) or caspase-8 inhibitor (▨), is relative to non-thermotolerant control cells at 37°C (□). For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**). (B, D).

Figure 11: Thermotolerance at 40°C protects cells against heat shock-induced chromatin condensation. Thermotolerant (B1-B4) and non-thermotolerant (A1-A4) cells were heated (37-45°C) for 2h. Non-thermotolerant cells were pre-treated with (C1-C4) Fas antagonist, (D1-D4) or caspase-8 inhibitor before heat treatment. Magnification: 320X. Fractions of apoptotic (F) and necrotic (G) cells are relative to total cells, for non-thermotolerant cells (□), with Fas antagonist (▨), or inhibitors of caspase-8 (■), caspase-10 (○) or caspase-2 (▨), and for thermotolerant cells (■). (F)

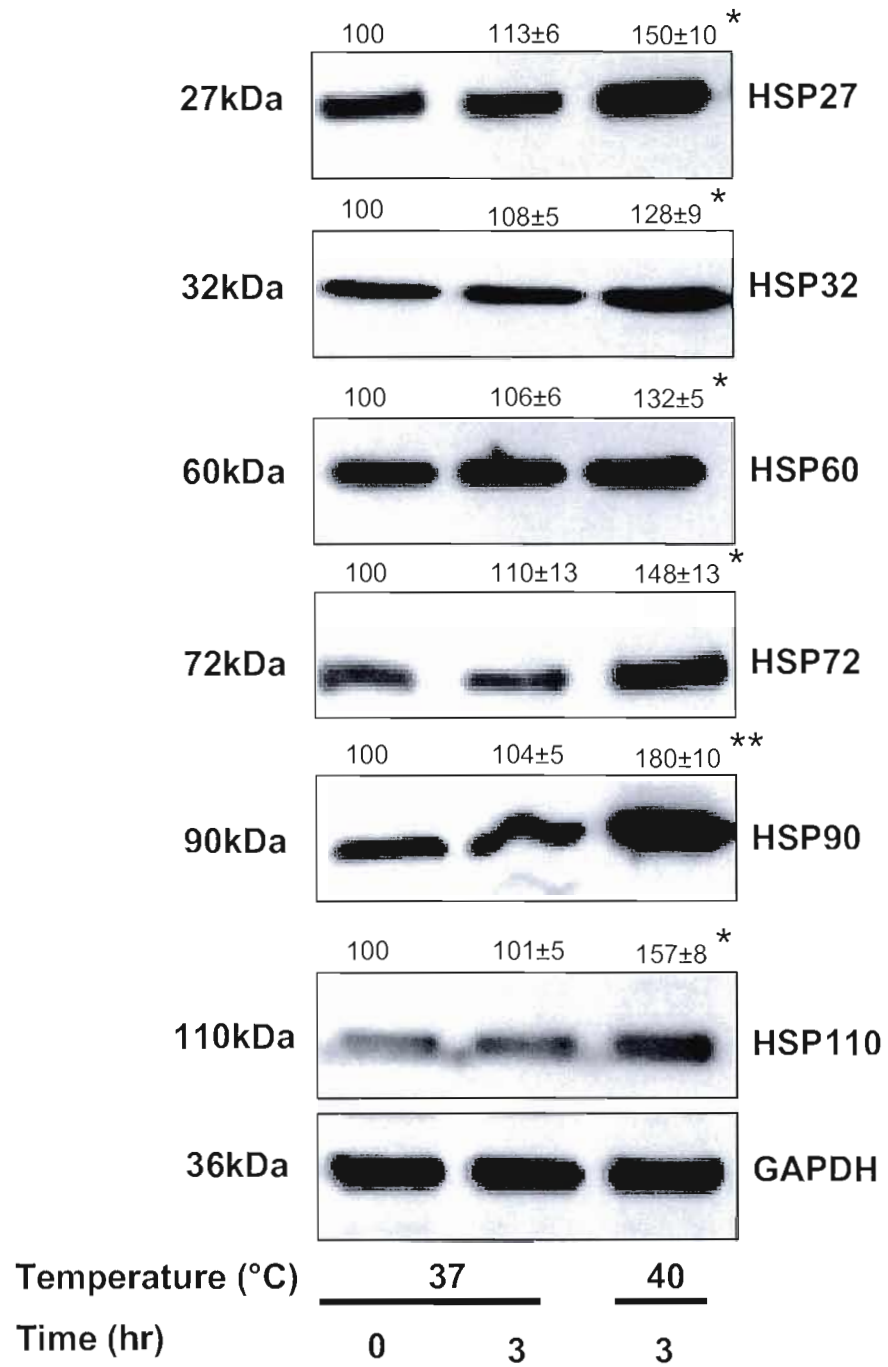
For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), for apoptosis or necrosis, $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

Figure 12: Mild thermotolerance inhibits promotion of ROS generation by heat shock. (A) Non-thermotolerant cells, with (◻) or without PEG-catalase (◻), and thermotolerant (◼) cells were heated (42-45°C) for 2h. Cells (10,000) were labelled with H₂DCF-DA and analysed by flow cytometry (FL1). (B) Protein expression of Fas ligand (B) was determined in non-thermotolerant cells, with (◻) or without PEG-catalase (◻). Activity of caspases-8 (C) in non-thermotolerant cells, with (◻) or without PEG-catalase (◻), was expressed relative to control cells, designated as 1.0. Data are means and SEM from at least 3 separate experiments. For significant differences between heated cells and untreated controls (37°C), $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

Scheme 1: Summary of protective effect of mild thermotolerance against activation of death receptor-mediated apoptosis by hyperthermia in HeLa cells.

Mild thermotolerance induced at 40°C abrogated induction of apoptosis by hyperthermia at the level of upstream and downstream events in the death receptor and mitochondrial signalling cascades. Heat shock caused an increase in (1) generation of reactive oxygen species (ROS) and (2) FasL expression. Membrane recruitment of (3) FADD and procaspase-8 led to formation of a complex with Fas receptor and (4) caspase-8 activation. Apoptosis was mediated through Fas receptor, since these events were inhibited by Fas/FasL antagonist Kp7-6. The antioxidant PEG-catalase abrogated increased expression of FasL and caspase-8 activation in response to heat shock. The mitochondrial pathway was activated by hyperthermia through the cross-talk pathway, mediated by (5) Bid cleavage. Heat-induced (6) translocation of tBid and Bax to mitochondria was mediated by death receptor signalling. Heat shock induced (7) cytochrome c release, activated (8) initiator

caspase-9 and (9) effector caspase-3, and caused (10) cleavage of PARP and ICAD, and chromatin condensation.

**Figure 1**

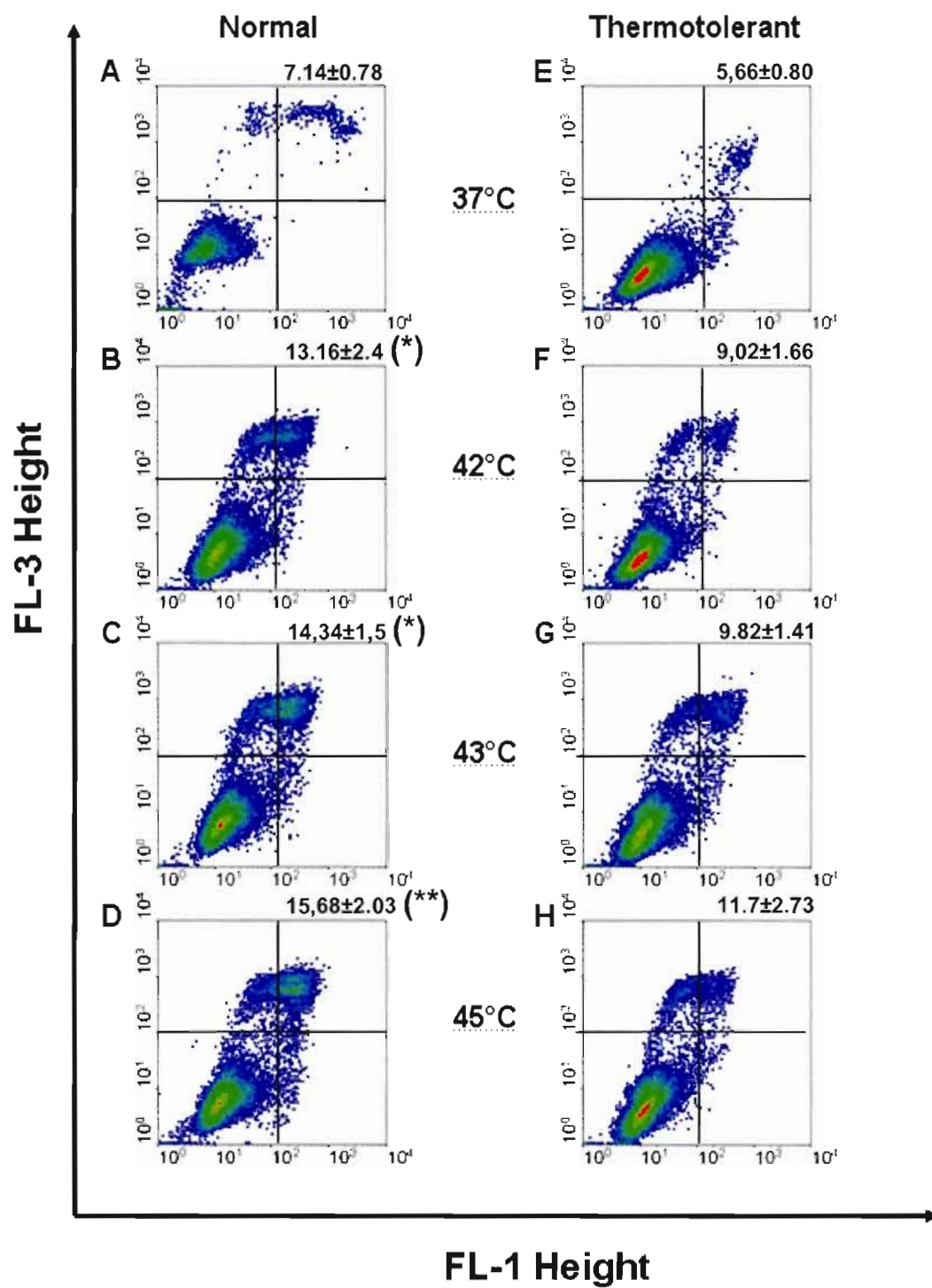


Figure 2A-H

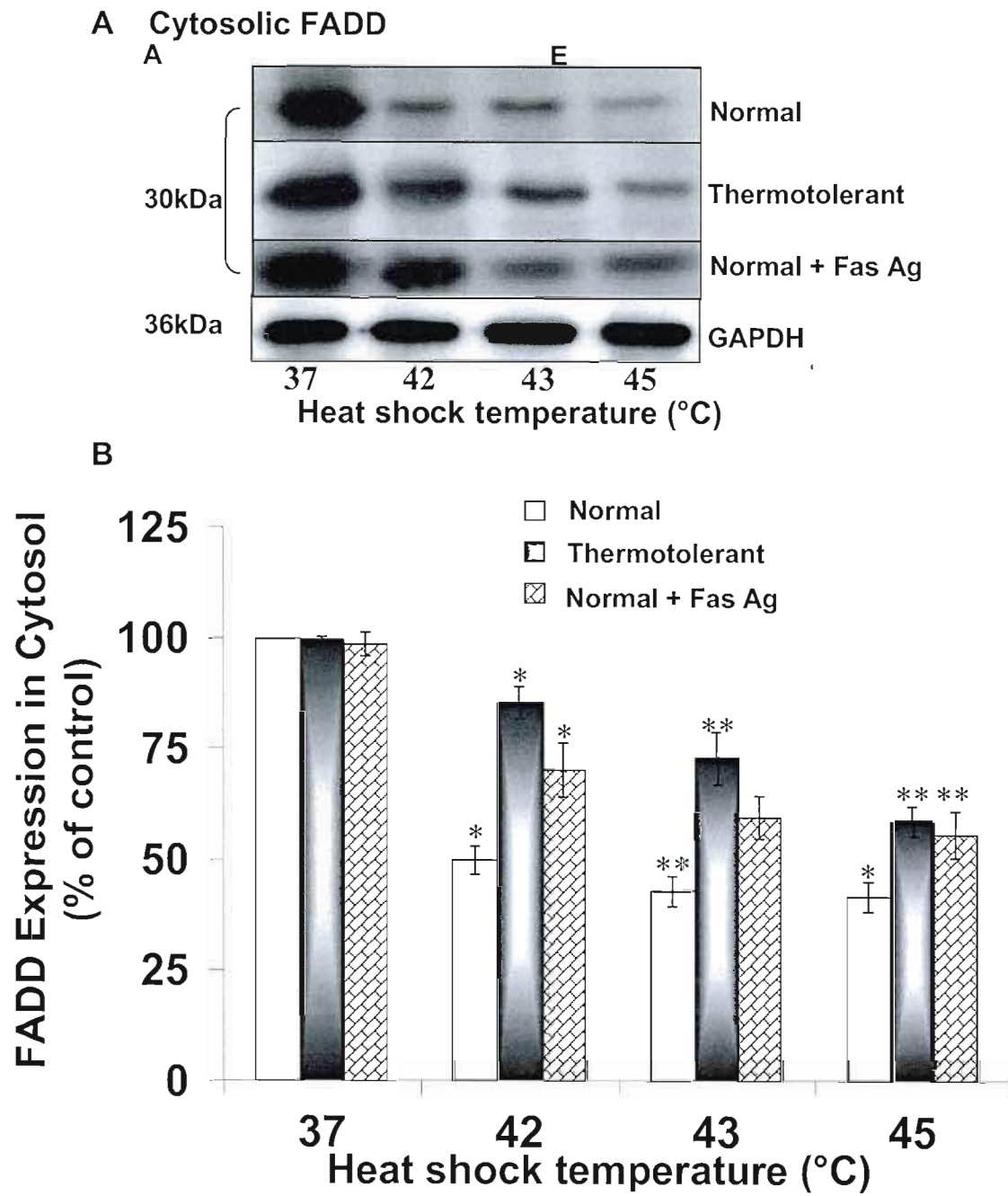
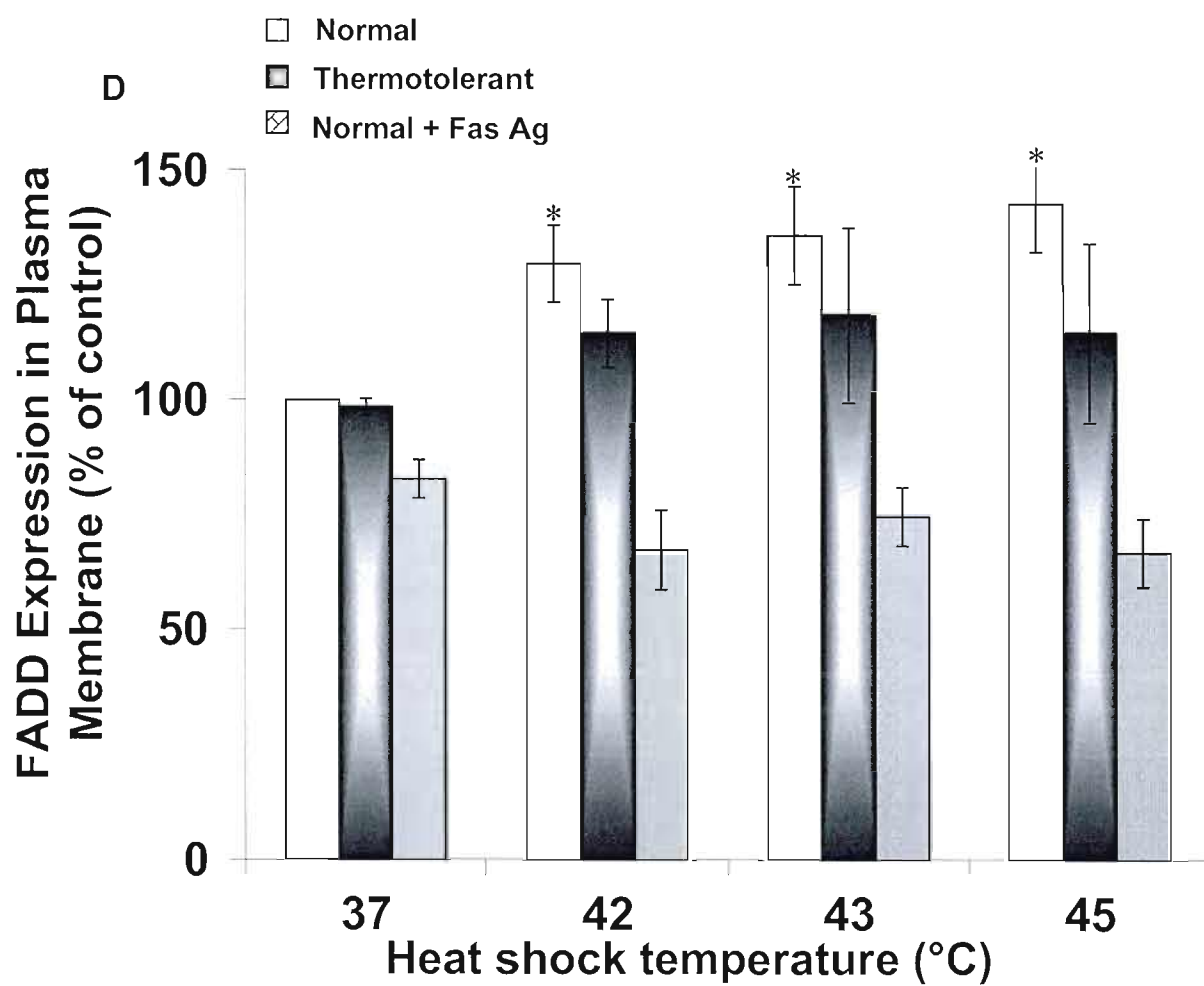
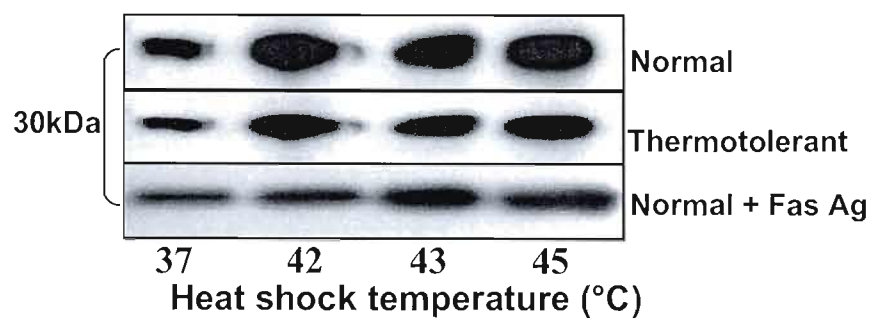
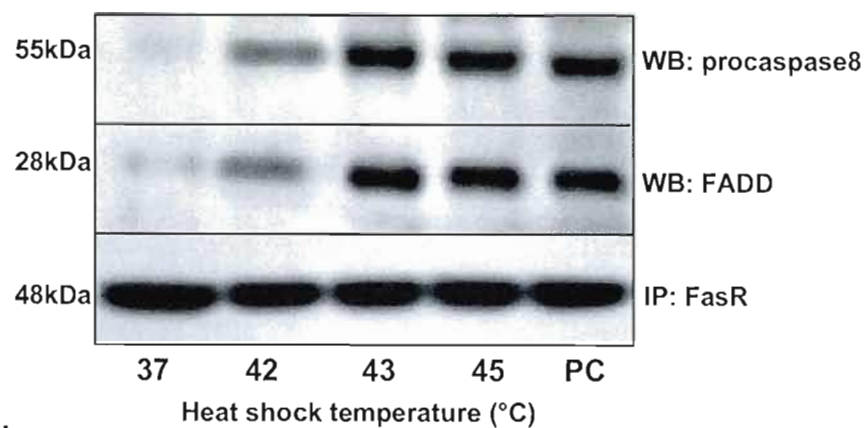


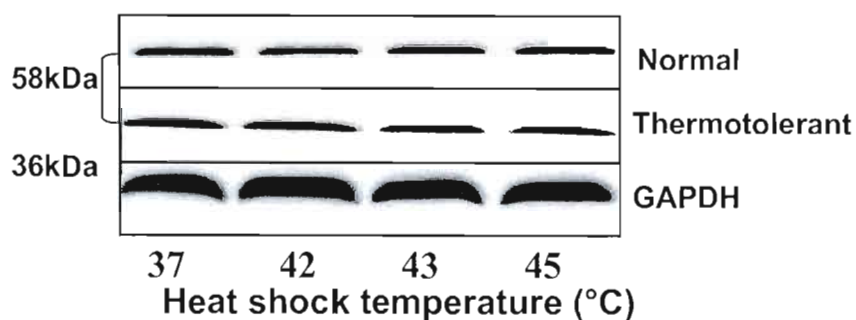
Figure 3A-B

C Plasma Membrane FADD**Figure 3C-D**

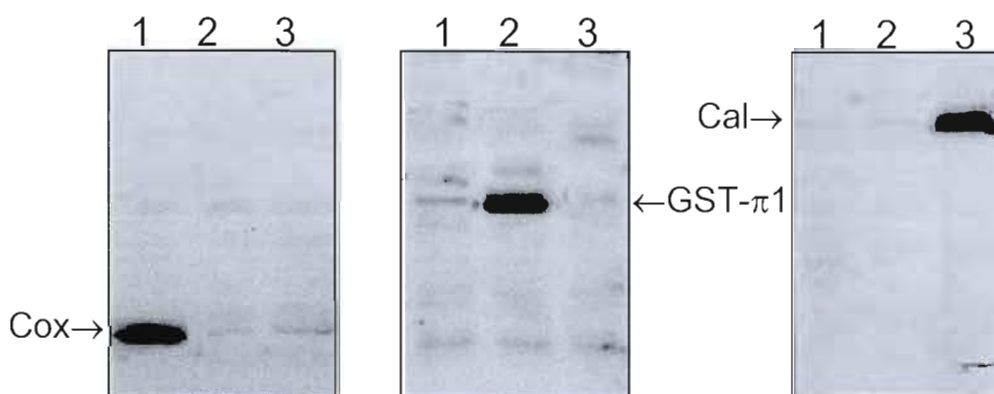
E-Immunoprecipitation of Fas-FADD-procaspase8 complex



F c-Flip

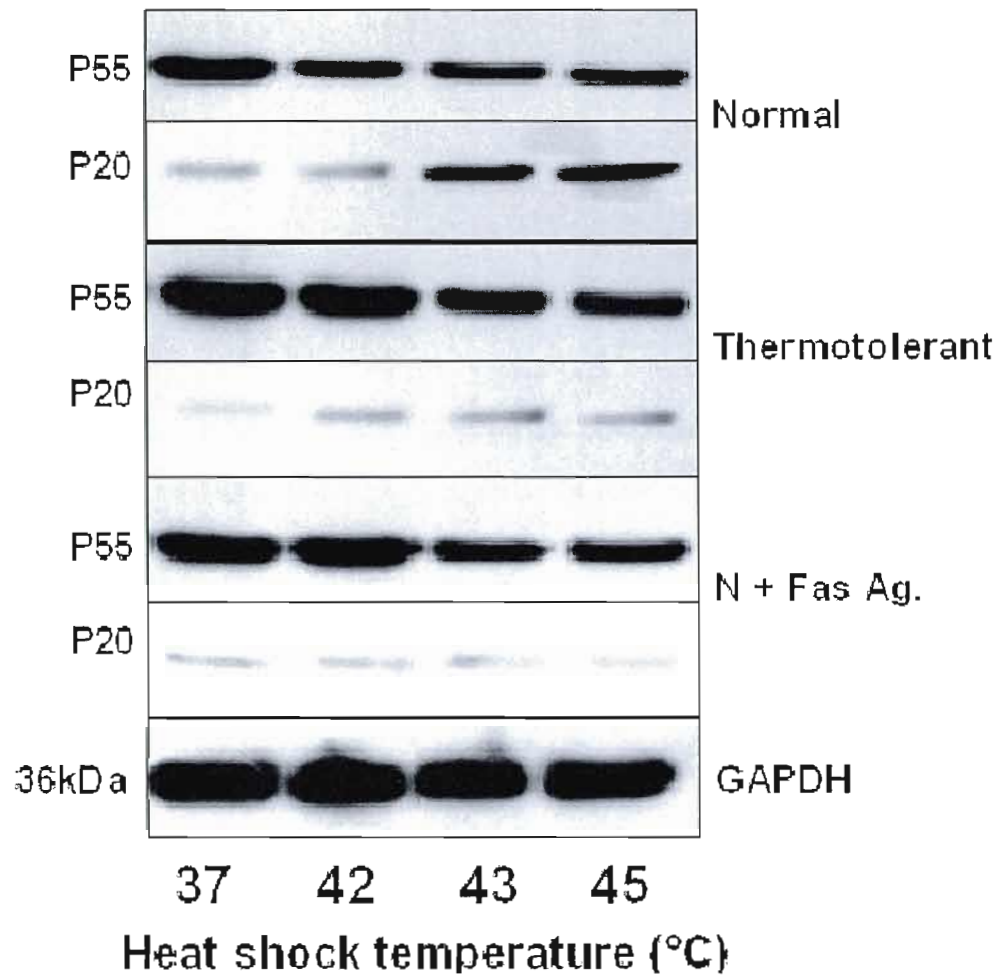


G Purity of Subcellular fractions



1: Mitochondrial fraction	97%
2: Cytosolic fraction	98%
3: Microsomal fraction	92%

Figure 3E-G

A**Figure 4A**

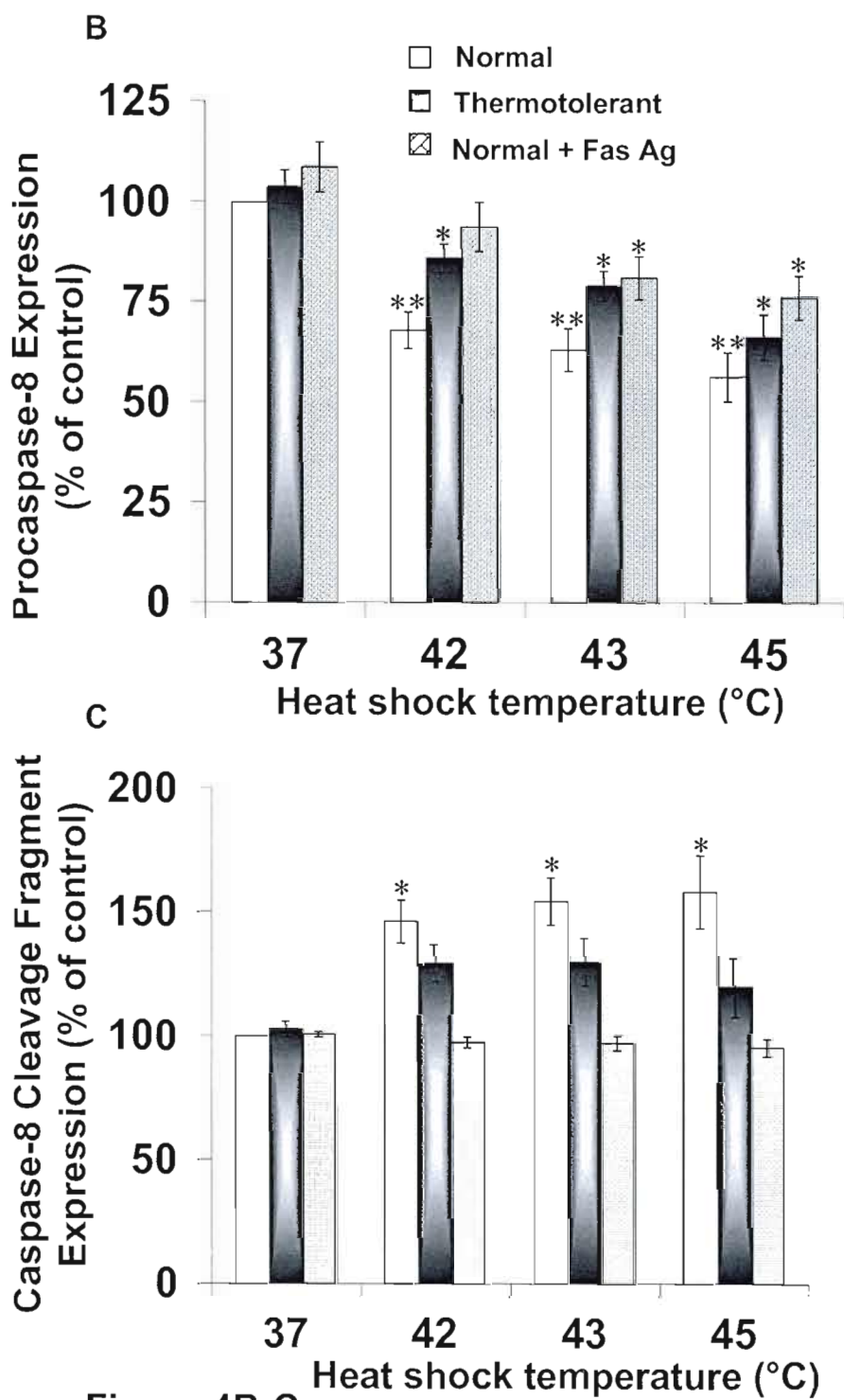


Figure 4B-C

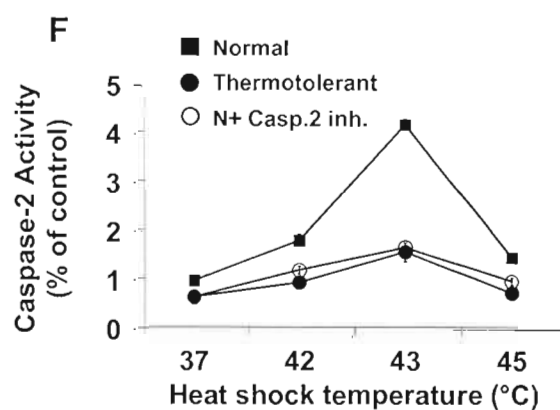
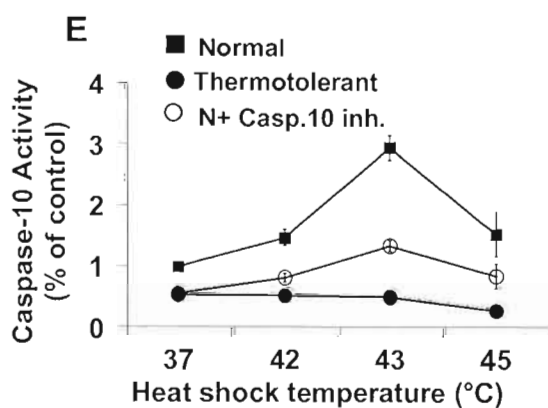
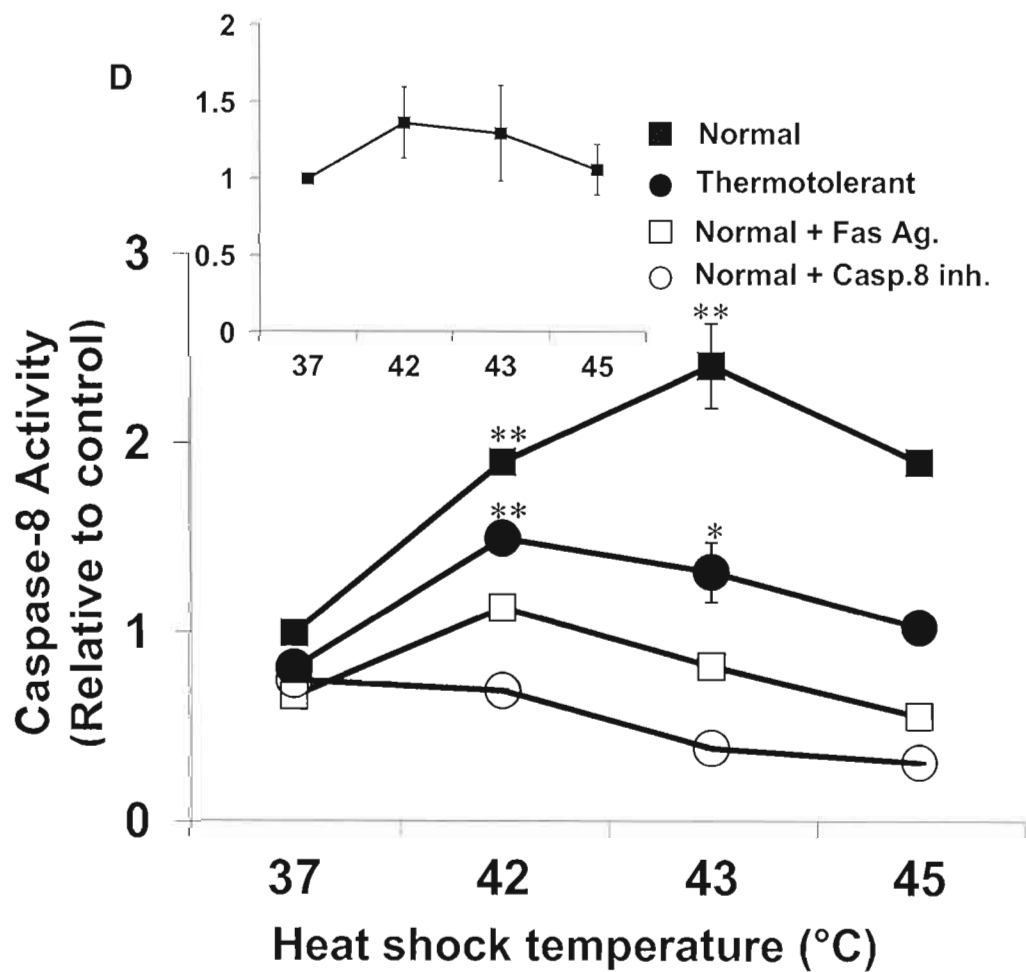


Figure 4D-F

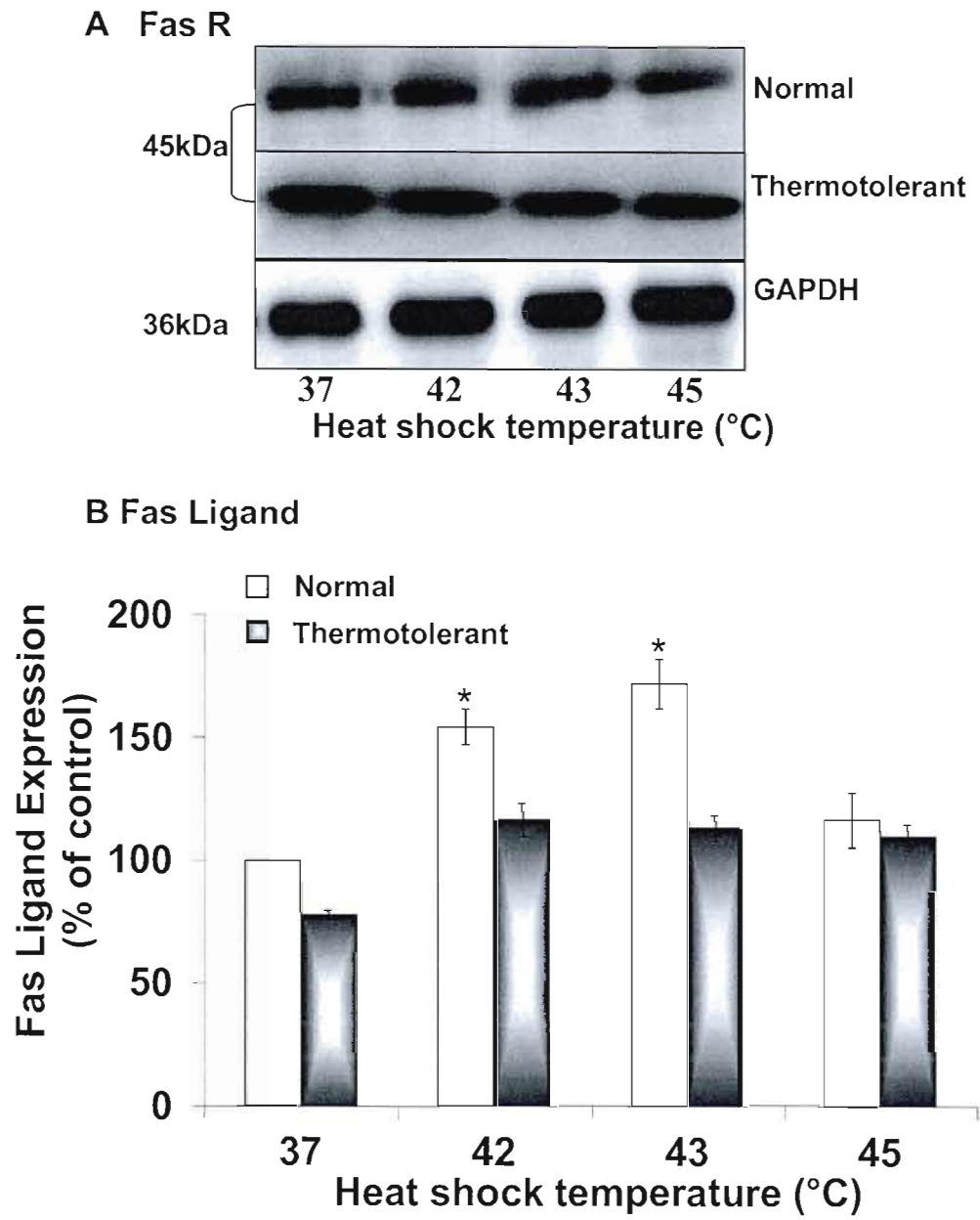


Figure 5A-B

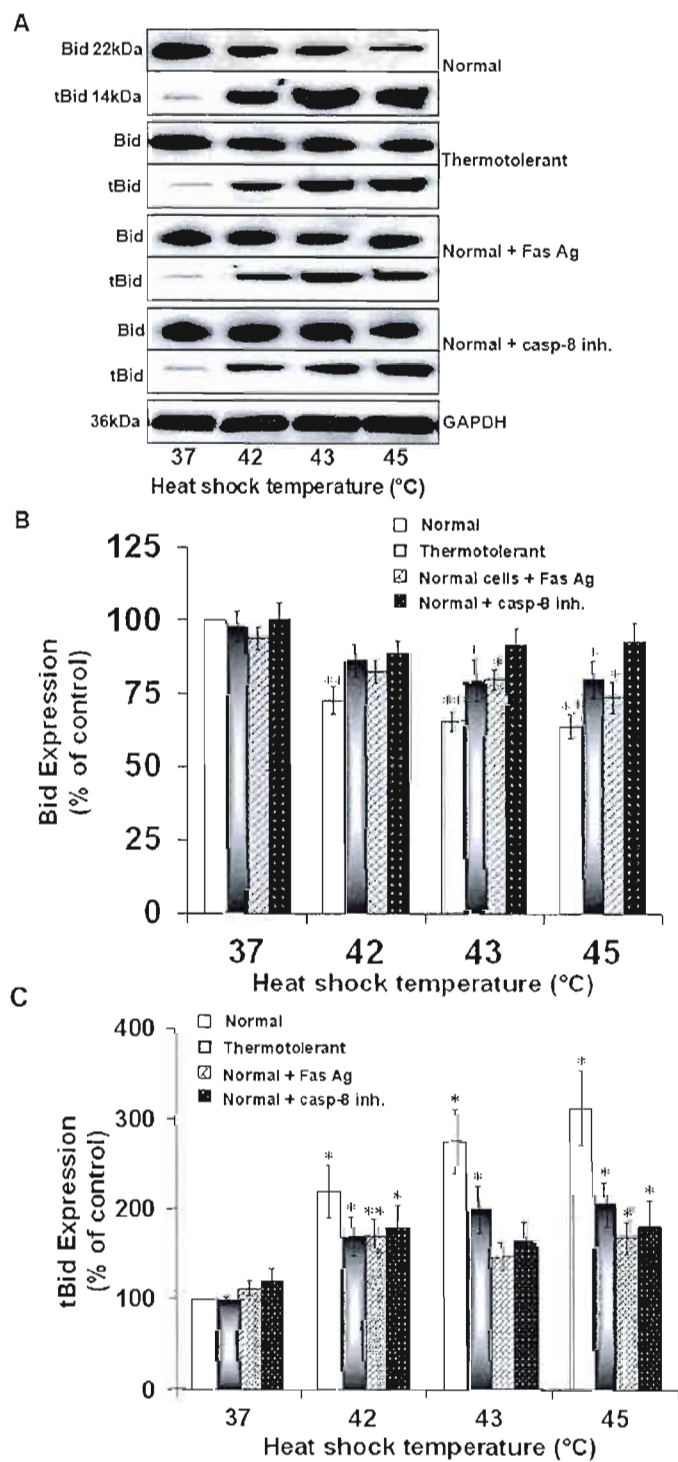
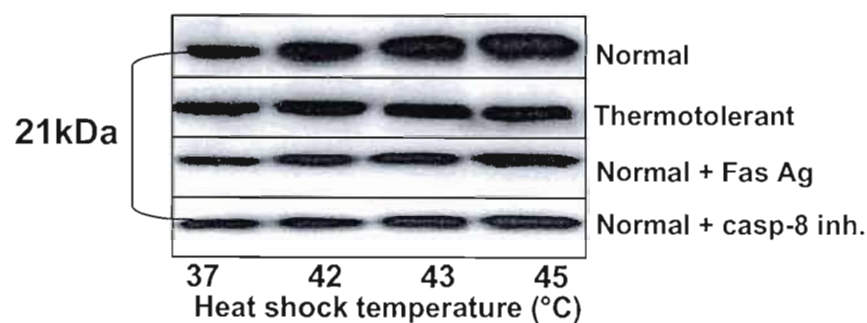
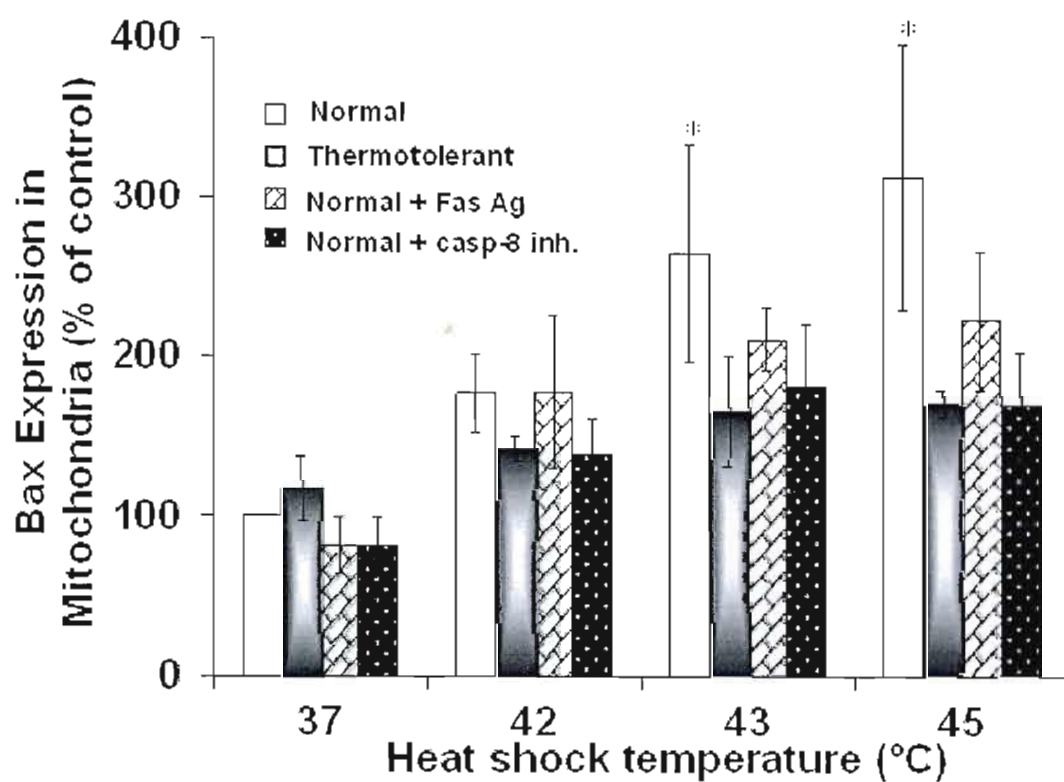
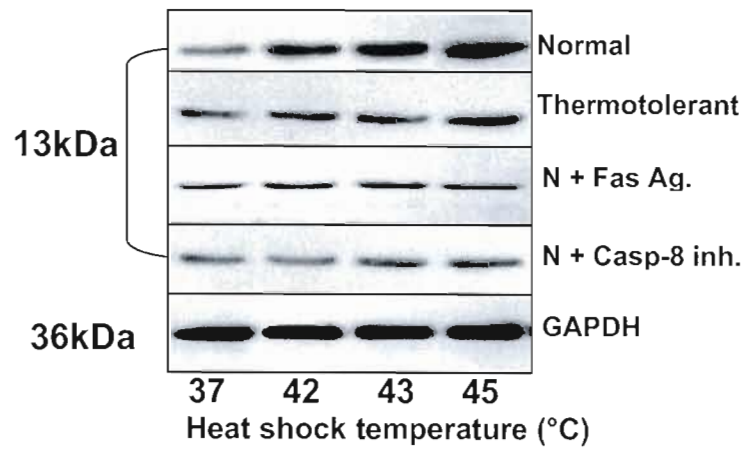
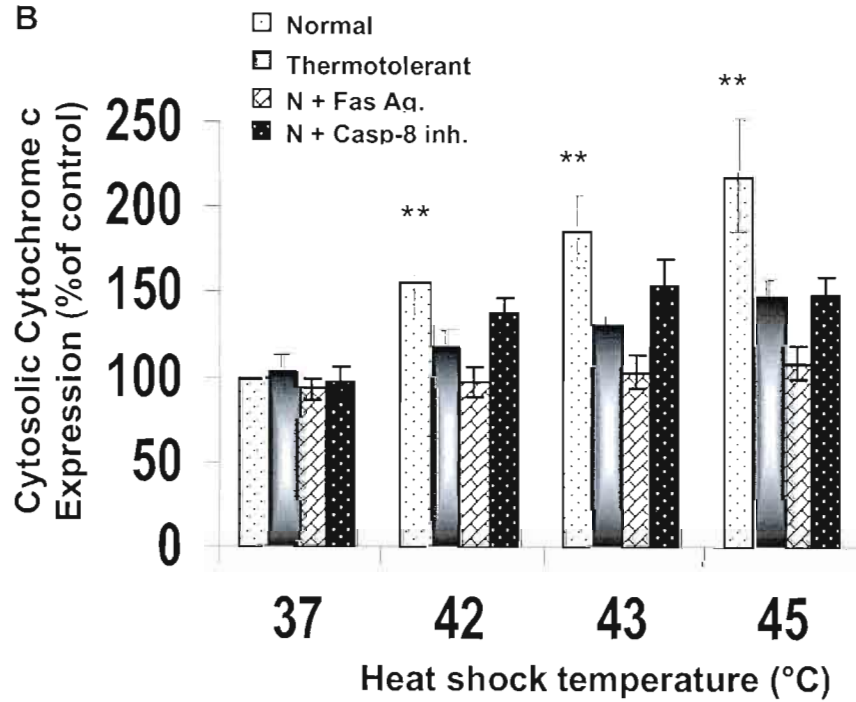


Figure 6A-C

A Mitochondrial Bax**B****Figure 7A-B**

A Cytosolic cytochrome c**B****Figure 8A-B**

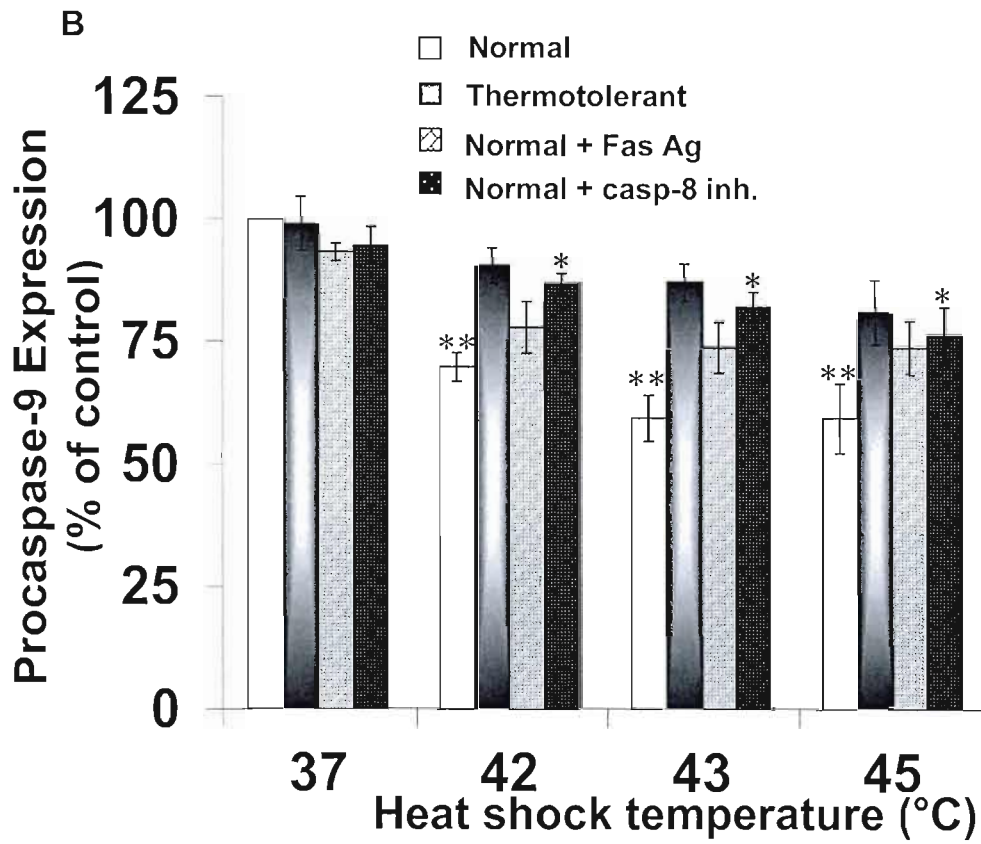
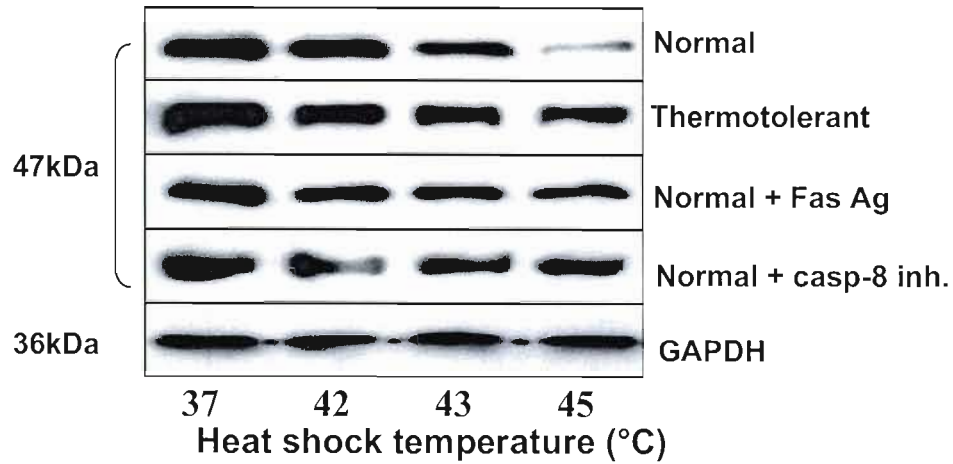
A Procaspase-9

Figure 9A-B

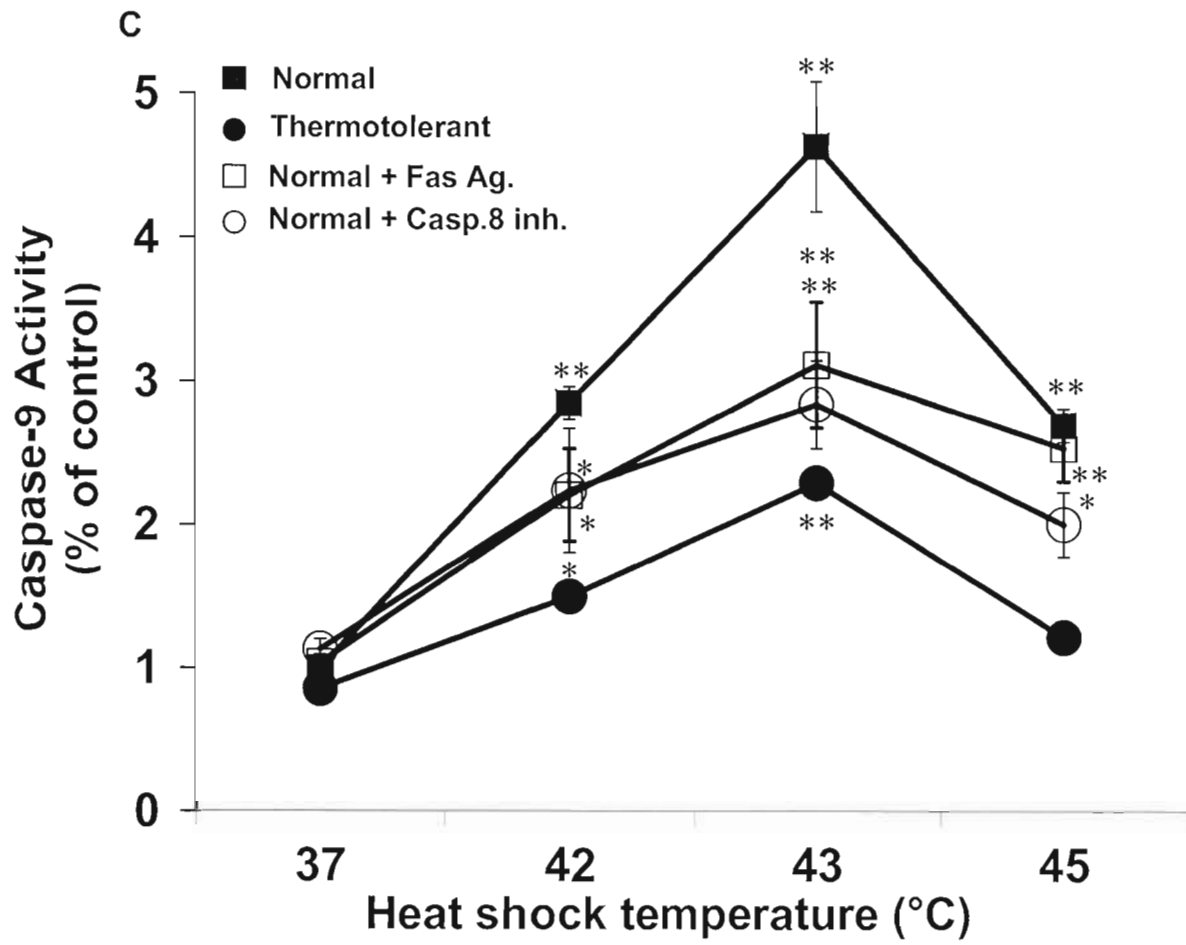


Figure 9C

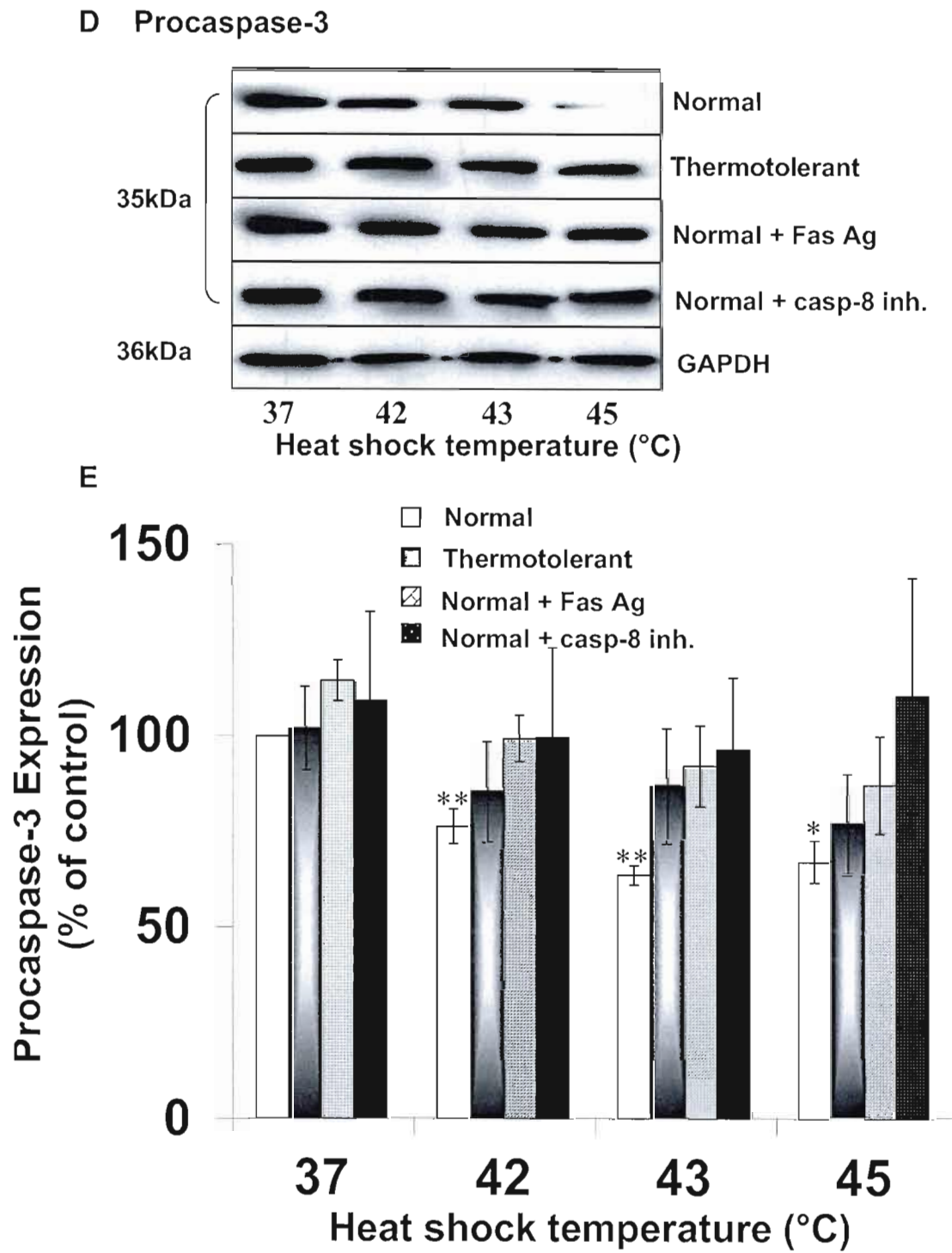


Figure 9D-E

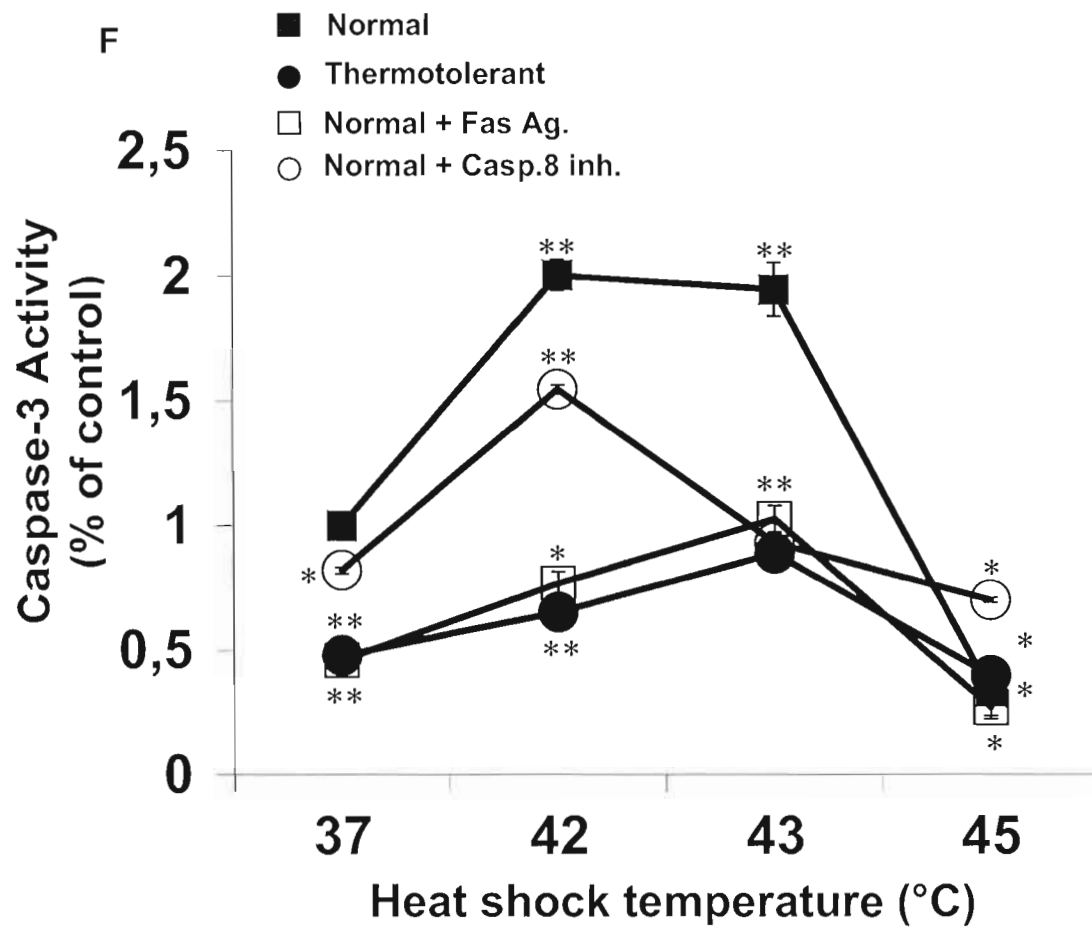
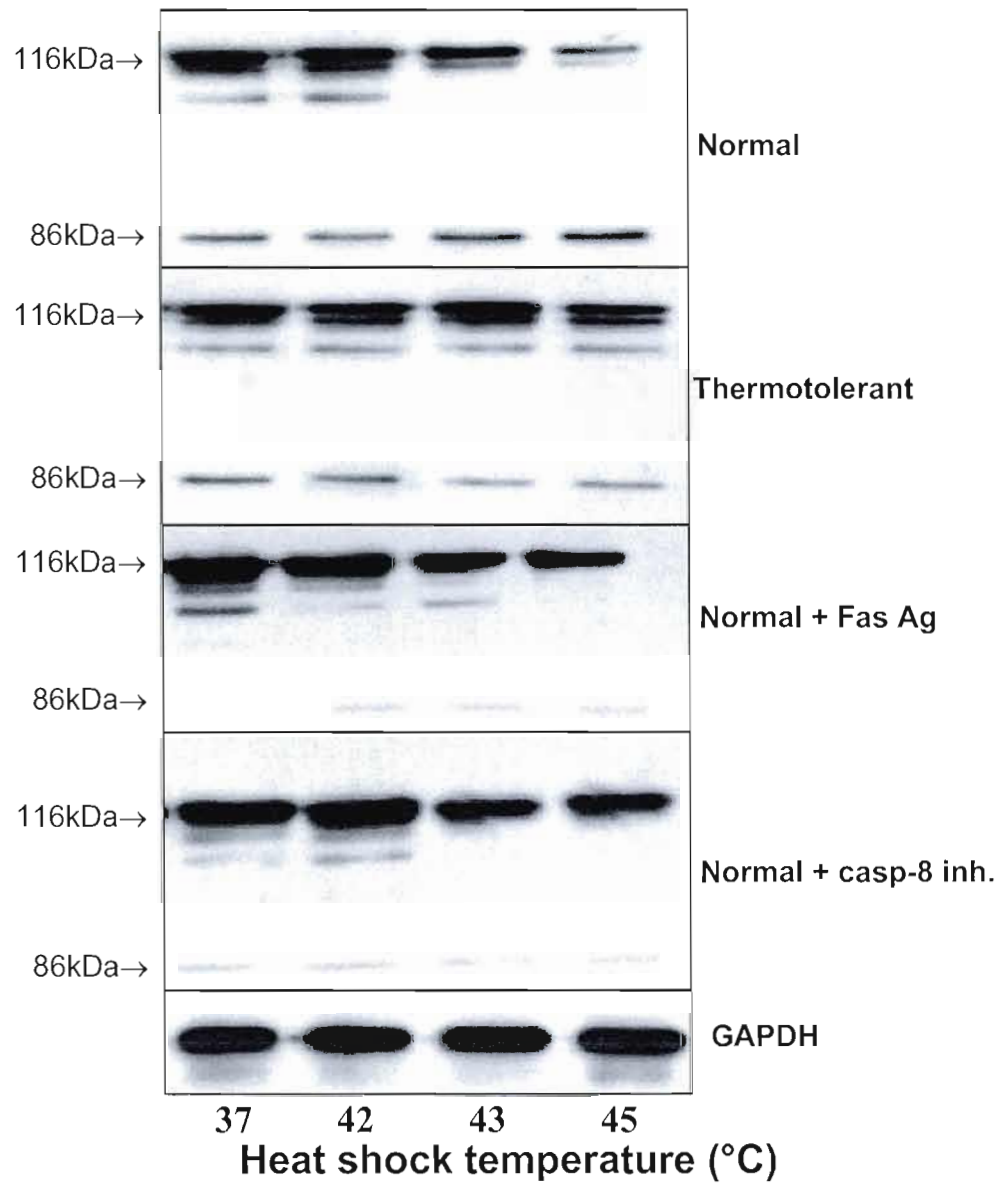


Figure 9F

A PARP**Figure 10A**

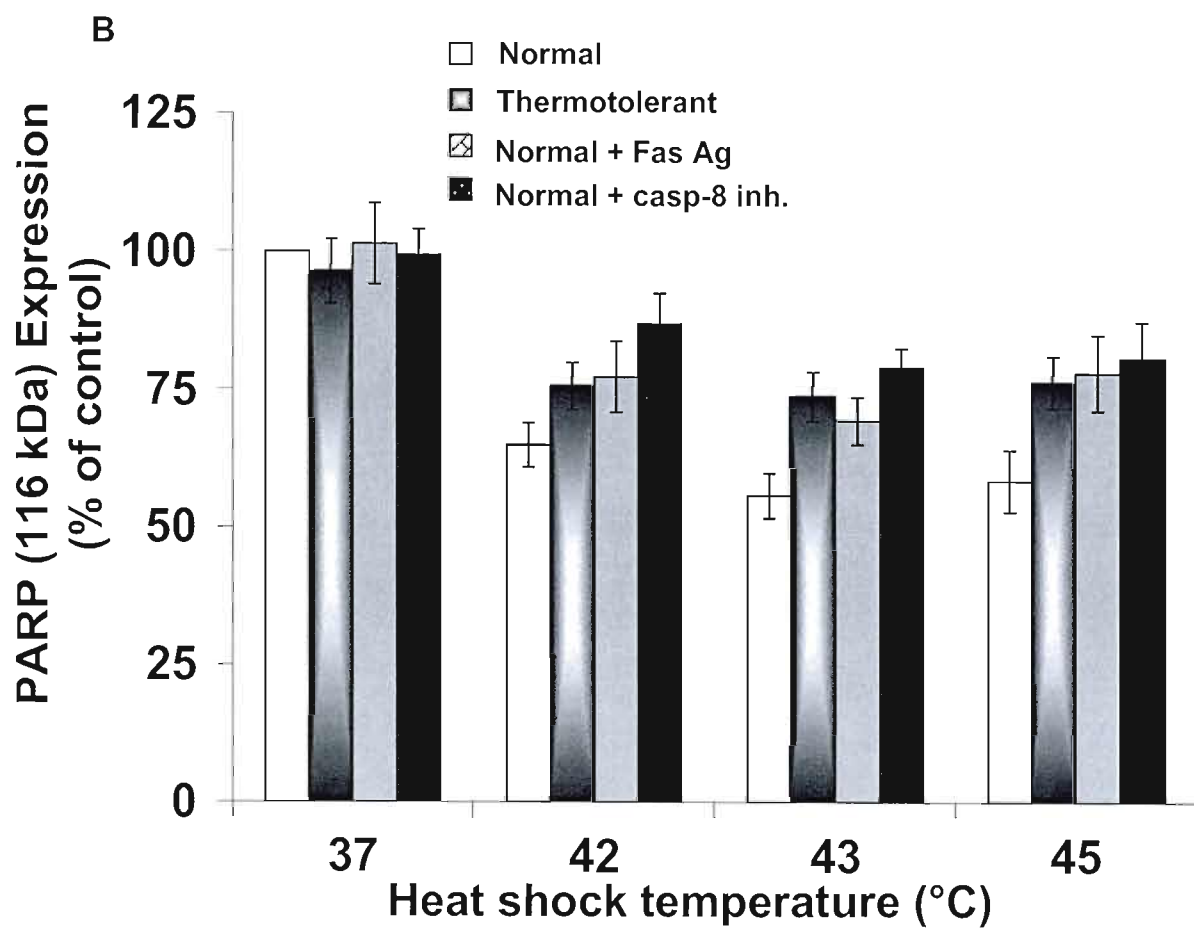


Figure 10B

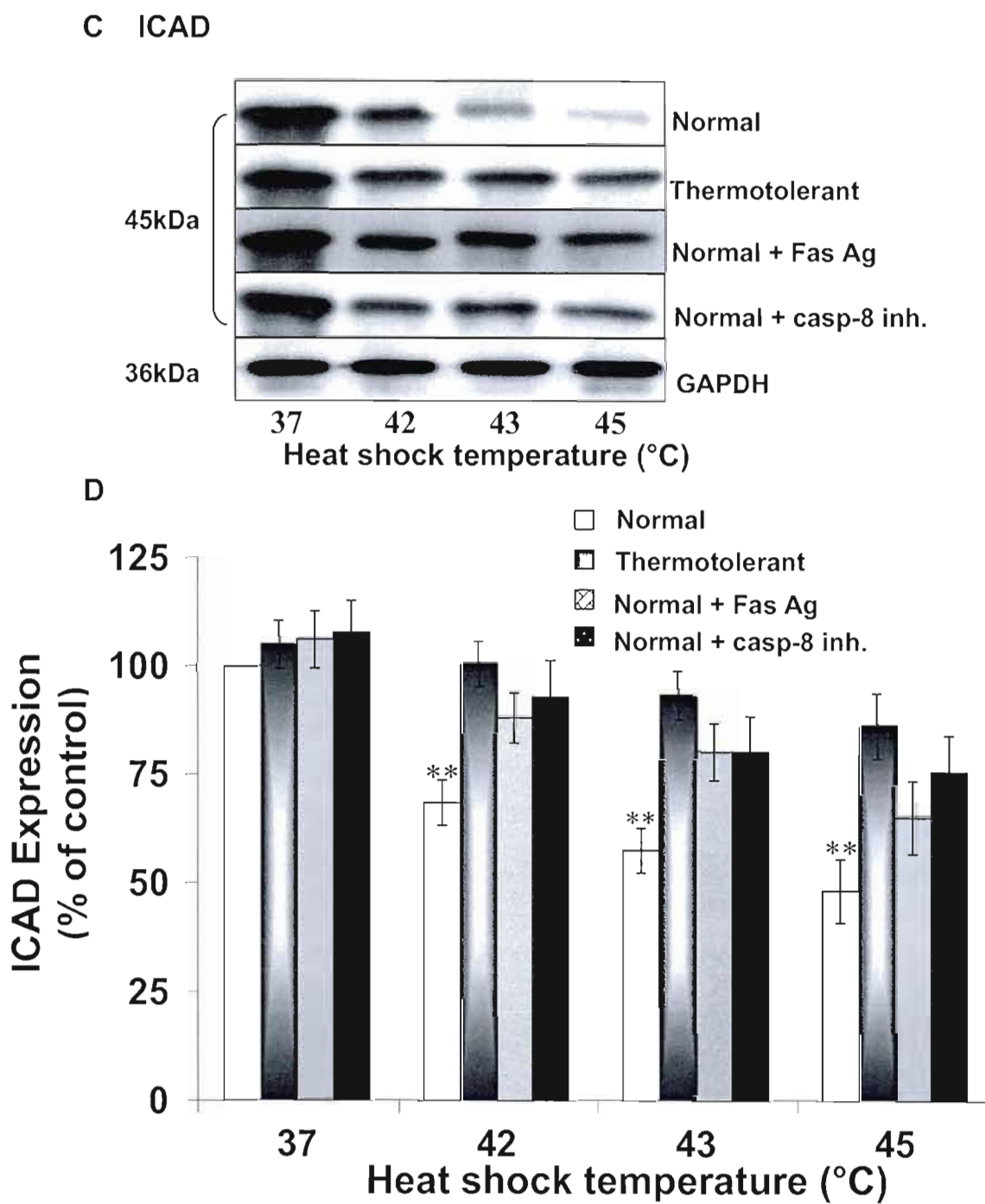


Figure 10C-D

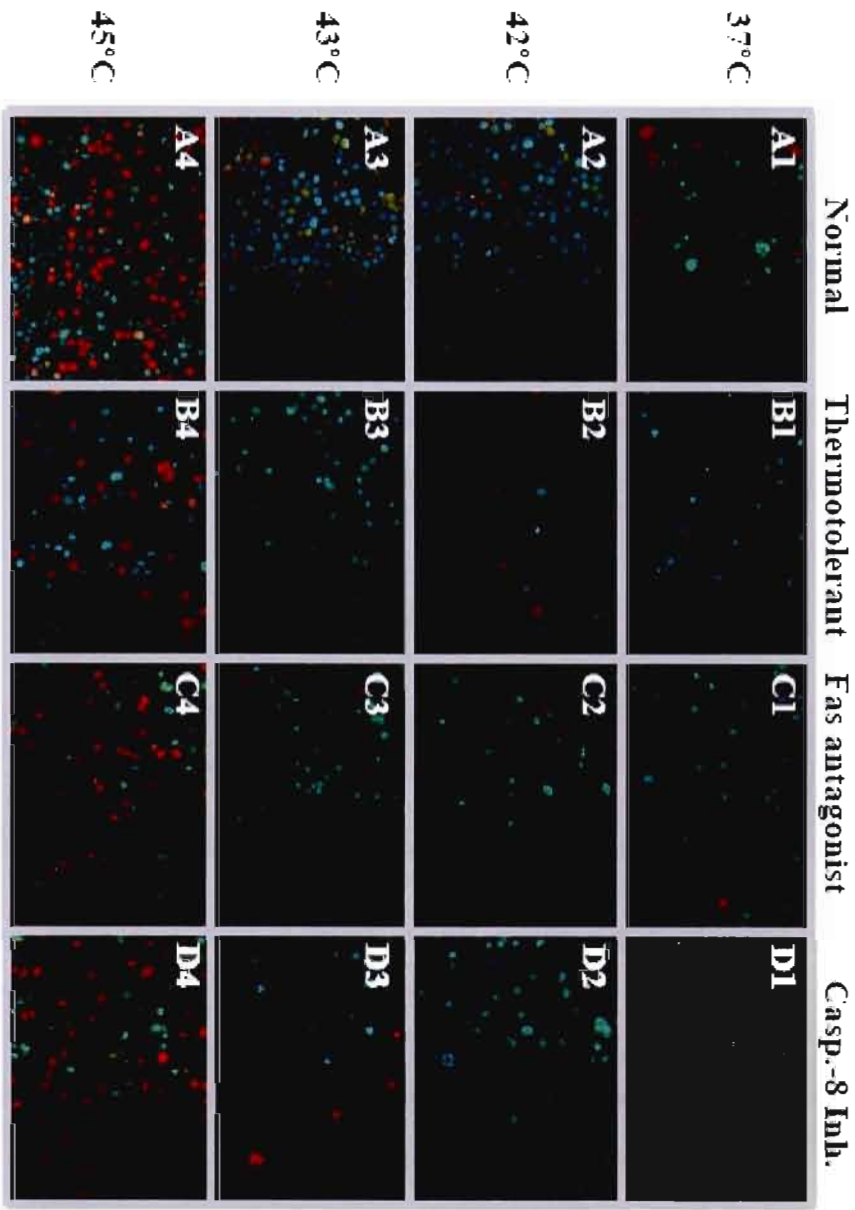


Figure 11A-D

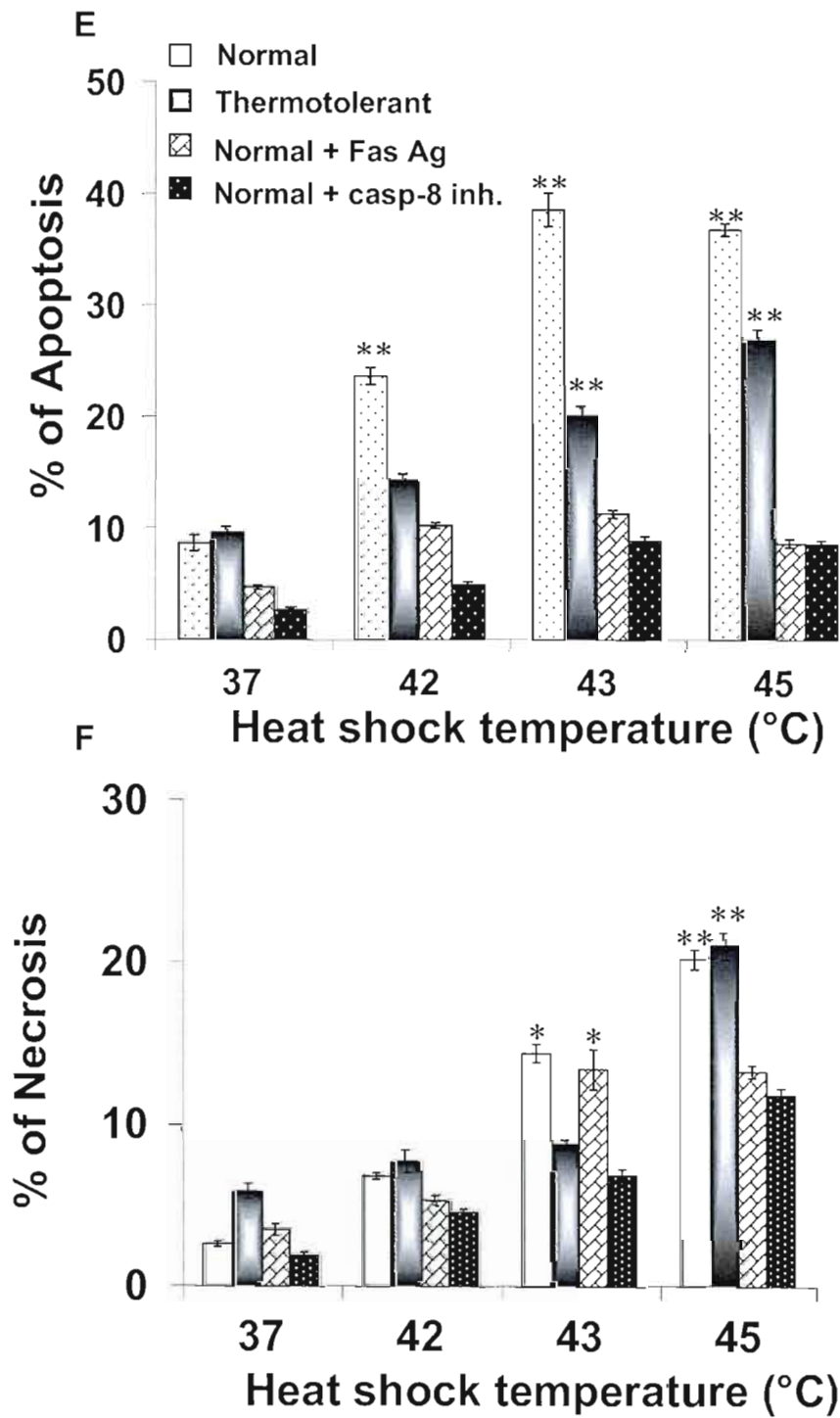


Figure 11E-F

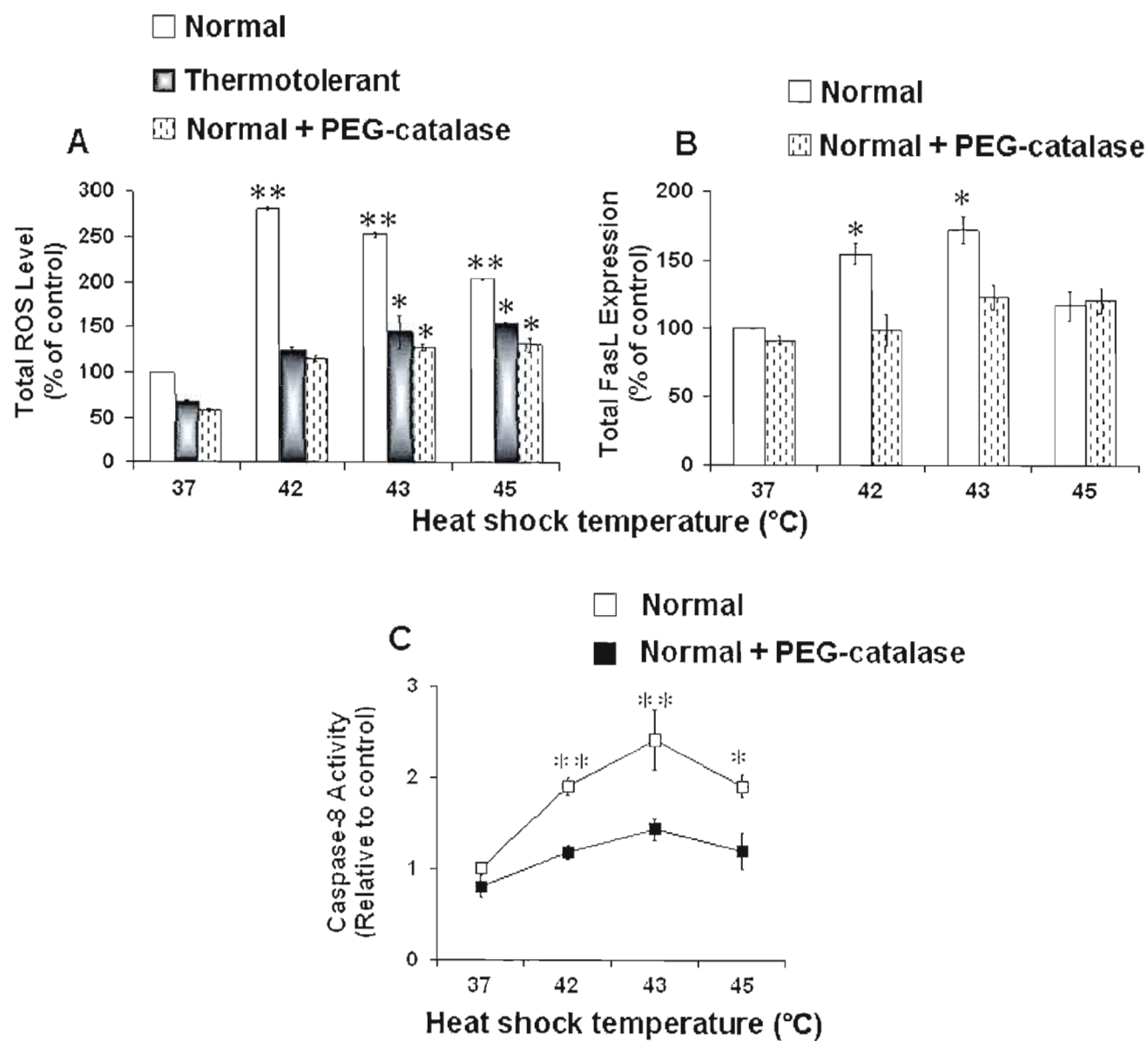
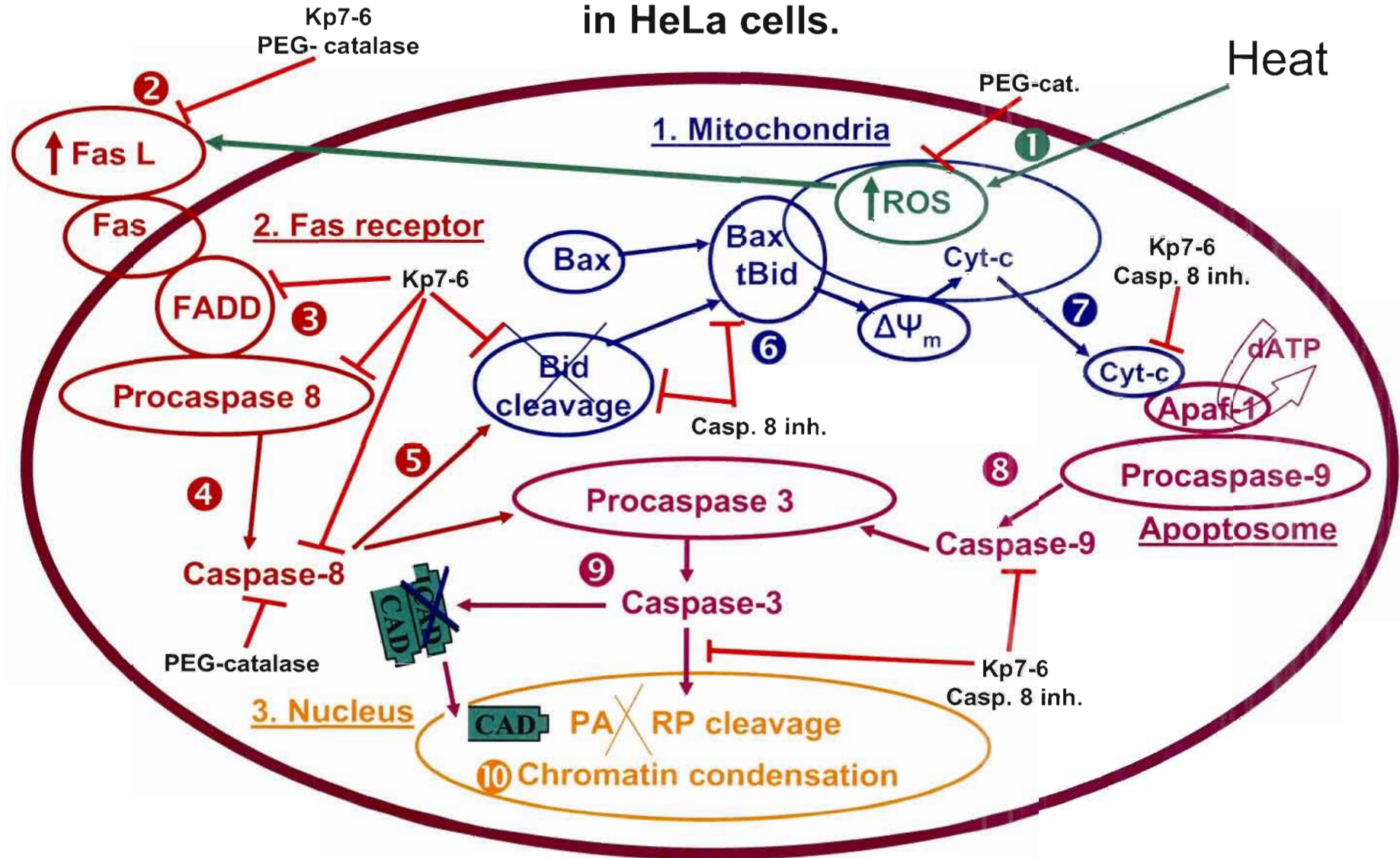


Figure 12A-C



Article 2:

**REGULATION OF HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS BY STRESS-
ACTIVATED MAP KINASES AND MILD THERMOTOLERANCE
IN HELA CELLS**

Ahmed Bettaieb¹ and Diana A. Averill-Bates^{1,2,*}

From Département des sciences biologiques¹, Université du Québec à Montréal, CP
8888, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Running head: Thermotolerance, MAPKs and heat-induced apoptosis

Address correspondence to: Diana A. Averill-Bates, PhD, Département des sciences
biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale Centre Ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3P8. Tel: (514) 987-3000(4811) Fax: (514) 987-

4647; Email: averill.diana@uqam.ca

²Formerly Dr. Diana Bates

Résumé :

Introduction: Bien que l'emploi thérapeutique de l'hyperthermie date de la fin des années 70, les mécanismes de toxicité du choc thermique envers les cellules cancéreuses et les cellules en général demeurent largement méconnus. Nonobstant, les études cliniques et fondamentales conduites à la nécessité de comprendre les réponses cellulaires aux agressions toxiques du choc thermique témoignent toutes de leur complexité et l'éventail des facteurs impliqués dans ces réponses. Nos études précédentes ont montré qu'un choc thermique létal induit la voie du récepteur de mort et la voie mitochondriale de l'apoptose, alors qu'un choc thermique doux protège les cellules contre la toxicité d'un choc thermique subséquent létal. Il est par ailleurs, bien établi que les protéines MAP kinases régulent de façon directe et/ou indirecte le déroulement de la cascade apoptotique.

Objectifs : Dans la perspective de mieux comprendre le rôle des protéines MAP kinases, en particulier p38 et JNK dans la régulation de la réponse cellulaire au choc thermique nous avons tenté de mettre en évidence les mécanismes qui contrôlent leur activation par le choc thermique et leur rôle dans la régulation de l'apoptose. Nous avons également étudié les conséquences de l'induction de la thermotolérance à un choc thermique doux (40°C) sur les voies de signalisation des MAP kinases p38 et JNK.

Méthodologie : Des cellules cancéreuses issues d'un carcinome du col utérin (HeLa) ont été pré-incubées à un choc thermique doux (40°C) pour induire un état de thermotolérance transitoire avant d'être exposées à un choc thermique subséquent létal (42-45°C). L'expression totale des MAP kinase et de leurs substrats phosphorylés ou non ainsi que leur distribution intracellulaire ont été étudiée par Western Blot. L'arrêt du cycle cellulaire a été observé avec un cytomètre de flux. La fluorométrie quant à elle, nous a servi pour étudier l'activité de la caspase 3. Finalement, nous nous sommes servis du test de Hoechst pour évaluer le taux de condensation de la chromatine.

Résultats : L'exposition des cellules HeLa à un choc thermique létal (42 à 45°C) a induit la génération des ROS, la translocation de Daxx au niveau de la membrane cytoplasmique, le recrutement de ASK-1 et l'activation des MAP kinases p38 et JNK sous l'effet du choc thermique. De plus, Bax et Bcl-2 sont phosphorylés par JNK et p38, respectivement. La protéine p53 quant à elle, est phosphorylée par p38 avant qu'elle soit transloquée au niveau du noyau et de la mitochondrie. Ces effets étaient moindres chez les cellules rendues thermotolérantes à 40°C et les cellules pré-incubées avec la PEG-catalase. Cependant, ni l'activité de la caspase 3 ni la condensation de la chromatine n'ont été réduits suite à l'utilisation de la PEG-catalase.

Conclusion : prise dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la génération des espèces réactives de l'oxygène ou le choc thermique est responsable de l'activation de p38 et de JNK sans qu'elle soit le seul et unique mécanisme de toxicité du choc thermique. D'autres études seront par conséquent nécessaires. De plus, l'induction de la thermotolérance, par contre, a protégé les cellules contre l'activation des MAP kinases et la toxicité du choc thermique.

Mots-clés : Hyperthermie, Thermotolérance, MAP kinases, JNK, p38, p53, Cycle Cellulaire, ROS, Apoptose, Caspase 3.

Abstract:

Hyperthermia is being used in cancer clinics with increasing success in combination with treatments such as chemotherapy and radiotherapy. However, mechanisms which mediate hyperthermia-induced cell death remain ill-defined. This study investigates the role of upstream regulators such as c-jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinases, p53 and reactive oxygen species (ROS) in hyperthermia-induced apoptotic cell death in HeLa cells. Hyperthermia (42-45°C) induced recruitment of Daxx to Fas receptor and activation of apoptosis signaling kinase-1 (ASK1). Hyperthermia activated JNK and p38, which was mediated through Fas receptor. Generation of ROS increased during heat shock and occurred upstream of Fas receptor, ASK1, JNK and p38 activation. Heat-induced JNK activation led to mitochondrial Bax translocation, loss of mitochondrial membrane potential, cytochrome c release and activation of the mitochondrial pathway. Hyperthermia caused p38-mediated phosphorylation of HSP27 and p53 proteins, which were translocated to mitochondria and the nucleus. p53 protein caused an imbalance in mitochondrial proteins by binding to anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL. At the transcriptional level, p53 increased expression of pro-apoptotic proteins Fas ligand, Puma, Noxa and Bax and down-regulated Bcl-2 and Bcl-xL. When thermotolerance was induced by mild heat (40°C), there was an overall decrease in hyperthermia-induced generation of ROS, activation of Fas, ASK1, JNK, p38, p53 and apoptosis. Our findings show that hyperthermia increases ROS generation, which leads to apoptosis that is mediated by activation of Fas death receptor and subsequent activation of ASK1, JNK, p38 and p53. These findings advance understanding of signaling mechanisms involved in hyperthermia-induced apoptosis in human tumor cells.

Keywords: Heat Shock, Thermotolerance, Apoptosis, Fas Receptor, Mitochondria, ROS, JNK, p38, p53.

Introduction:

There has been renewed interest in using high temperatures to treat cancer during the past two decades. The goal of hyperthermia is to improve cancer treatment by targeting toxicity to tumors, while decreasing the side effects of conventional therapies. Additionally, tumours have been shown to be more vulnerable to heat injury than normal tissues (Babbs and DeWitt 1981). Hyperthermia is mainly used in the cancer clinic in combination with cytotoxic treatments such as chemotherapy and radiotherapy (Hildebrandt, Wust et al. 2002; van der Zee 2002). Heat can potentiate antitumor toxicity of these treatments, leading to improved therapeutic index. There is extensive pre-clinical data showing that in combination with radiation, hyperthermia is one of the most effective radiation sensitisers known (Horsman and Overgaard 2007).

The heat shock (HS) response in mammalian cells depends on the temperature and duration of the heat treatment. Mild (38–41°C) HS can induce the phenomenon of thermotolerance and the expression of heat shock proteins (HSPs). Meanwhile, prolonged exposure to higher temperatures (>42°C) can cause a variety of detrimental effects in cells including protein denaturation and aggregation, generation of reactive oxygen species (ROS), DNA damage and eventually cell death (Hildebrandt, Wust et al. 2002; Lepock 2004). However, it remains unclear how HS can cause cell death.

Thermotolerance can be induced by short exposure to lethal temperatures such as 42 to 45°C, or by longer exposures to non-lethal temperatures in the fever range such as 39 to 41°C (Field and Anderson 1982; Przybytkowski, Bates et al. 1986). Thermotolerance is a transient phenomenon that is lost within two to three days as expression of the inducible form of HSPs diminishes (Landry, Bernier et al. 1982; Subject, Sciandra et al. 1982). HSPs are induced under various stress conditions to counteract stress-induced apoptosis caused by accumulation and aggregation of denatured proteins. As "chaperone" proteins, they are concerned with the intracellular folding, refolding, assembly and translocation of proteins, particularly those damaged

by stress. Both constitutively expressed and inducible forms of HSPs exhibit a potent role in preventing the induction of cell death by various stresses (Beere 2004).

Several reports have demonstrated that HS can activate apoptosis through the mitochondrial pathway (Mirkes and Little 2000; Bettaieb and Averill-Bates 2005; Klostergaard, Leroux et al. 2006). However, the upstream pathways involved in regulating this response are not well understood. HS has been shown to activate apoptosis signalling kinase 1 (ASK-1), as well the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Dorion, Lambert et al. 2002). ASK-1 is also an upstream regulator of the JNK and p38 MAPKs during exposure to other stressful stimuli such as hyperosmotic shock, oxidative stress, cold shock, UV irradiation, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (Dorion, Lambert et al. 2002; Fujisawa, Takeda et al. 2007). The MAPK JNK can be activated through death receptors such as Fas, which is mediated through the death receptor-associated protein Daxx and ASK-1 (Chang, Nishitoh et al. 1998). JNK activation was shown to reduce the anti-apoptotic activity of Bcl-2 by causing its phosphorylation (Liu and Lin 2005). p38 MAPK is able to activate and stabilise p53 under conditions of stress induced by UV rays (Huang, Ma et al. 1999; Chouinard, Valerie et al. 2002). HS activated p53 and interaction with HSP90 contributed to its stabilization after HS (Wang and Chen 2003). However, the upstream activator(s) in HS-induced activation of p53 are not known. Therefore, the molecular links between HS-induced apoptosis and activation of upstream regulators such as JNK, p38 and p53, require clarification.

HS has been shown to generate free radicals (Flanagan, Moseley et al. 1998) and cause an imbalance in the redox equilibrium (Lord-Fontaine and Averill-Bates 2002). Reactive oxygen species (ROS) appear to play critical roles as second messengers in the determination of cell fate and can regulate several signalling cascades, including receptor signalling and MAPKs (Matsuzawa and Ichijo 2008). We therefore determine the links between HS-induced ROS generation and activation of the apoptotic cascade. This study also investigates the role of the ASK-1/JNK/p38

MAPK pathways in mediating HS-induced apoptosis through the Fas death receptor in HeLa human tumor cells and possible links with activation of p53. The ability of mild thermotolerance induced at 40°C to protect cells against activation of these signalling cascades by HS is also considered.

Experimental Procedures

Cell culture- Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (ATCC no. CCL-2) were cultured as monolayers in Eagle's modified Dulbecco medium supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) and 10% foetal bovine serum (Gibco Canada, Burlington, ON) at 37°C and 5% CO₂ (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Medium was replaced with fresh medium 24 h prior to experiments. Cells were harvested using 0.5mg/ml trypsin/0.2mg/ml EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1,000xg, 3min). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3h, evaluated by trypan blue exclusion.

Heat treatment- To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to an incubator for 3h at 40°C ± 0.1°C, following a period of 20 min to allow the temperature of the culture medium to reach 40°C (Przybytkowski, Bates et al. 1986). Non-thermotolerant cells were pretreated with inhibitors of Fas activation (250 µM Kp7-6), MAPKs (20 µM PD98059 for JNK, 10 µM SB328020 for p38), p53 (20 µM pifithrin-α (PFT)), proteasome (50 µM ALLN) (Calbiochem, La Jolla, CA), protein synthesis (25 µM cycloheximide) or ROS (polyethylene glycol (PEG)-catalase, 300 U/ml) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), as indicated. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (37-45°C) for 3h in temperature-controlled waterbaths (±0.02°C) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, Canada), allowing 3 min for the cell suspension to reach the appropriate temperature.

ROS generation- The generation of pro-oxidants was measured following heat treatment. Cells were labelled with 2'7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) (10 µM), which produces green fluorescence when it becomes oxidized by ROS (Yang, Lee et al. 2007). Data for 10,000 cells were collected using a FACScan flow cytometer equipped with an argon laser (488 nm) (FL-1 channel, Em:

515 nm) and analyzed using Cell Quest software (Becton-Dickinson, Menlo Park, CA).

Western blot analysis of protein expression- After heat treatment, cells were lysed in buffer T (Samali, Cai et al. 1999) containing 100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 5% freshly added percoll, 0.01% digitonin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and cocktail of protease inhibitors (pH 7.4). Thereafter, debris, unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation (10,000g, 10 min). Proteins (30 µg) (Bradford 1976) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8%-12%) (Laemmli 1970) and immunodetected using primary antibodies recognizing p53, phospho-p53, JNK, phospho-JNK, p38, phospho-p38, Bcl-2, Bax, cytochrome c, Puma and Noxa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal secondary antibodies were from Biosource (Camarillo, CA). Protein expression was analysed using IPGEL software, relative to GAPDH loading controls.

Subcellular fractionation- Following heat treatment, subcellular fractionation was performed as described previously (11) with modifications. Cells were washed with cold buffer W (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4) and resuspended in lysis buffer F (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 mM DTT, 5% freshly added percoll, 0.01% digitonin, 1 mM PMSF and cocktail of protease inhibitors, pH 7.4). Membranes were broken using a dounce homogenizer (200 strokes/sample). Debris and unbroken cells were removed by centrifugation (500g for 10 min) and supernatants were then centrifuged (2,500g, 5 min) to separate nuclei (pellet). Supernatants were then centrifuged (15,000g, 15 min) to separate mitochondria. Supernatants were centrifuged (100,000g, 1h) to separate the cytosolic and microsomal (pellet) fractions. Nuclear, mitochondrial and microsomal fractions

were resuspended in lysis buffer T. Cellular distribution and translocation of different proteins (30 μ g) were analysed by Western blotting. Purity of nuclear, microsomal, cytoplasmic and mitochondrial fractions was verified using antibodies against lamin A, calnexin, GST π 1 (Calbiochem, La Jolla, CA) and cytochrome c oxidase (Molecular Probes, Eugene, OR), respectively.

Immunoprecipitation- Following heat treatment, cell lysates were prepared by extraction with cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, and 1% Triton-X, pH 7.5 supplemented with protease inhibitors) for 30 min at 4°C. Debris was removed from lysates by centrifugation at 15,000g for 10 min. For immunoprecipitation (Harlow and Lane, 1999), lysates were incubated with 50 μ l of protein A-agarose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) precoated with rabbit anti-Fas polyclonal or mouse monoclonal anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies for 2h at 4°C. The beads were washed three times with RIPA buffer and the appropriate proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE and Western blotting.

Fas ligand expression- Following HS treatment, cells were fixed with 1% formaldehyde at room temperature for 20 min and permeabilized with saponin buffer (20 mM Hepes/138 mM KCl/4 mM MgCl₂/0.2 mg/ml saponin/1% BSA/1 mM ATP/3 mM phalloidin) for 1 min. Cells were then washed twice in saponin-free buffer, and labelled for 1h at 37°C with 20 mg/ml of R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated mouse anti-human CD95 monoclonal antibody (Caltag laboratories, Burlingame, CA). Cells were washed three times with 0.5% BSA in PBS and fluorescence intensity of 10,000 cells was analyzed using a FACScan flow cytometer (FL-2 channel) and Cell Quest software.

Mitochondrial membrane potential (MMP)- Following heating (1h, 37-45°C), cells

were incubated with the dye 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetra-ethyl-benzimidazolyl-carbocyanine-iodide (JC-1) (5 μ M) (Molecular Probes) for 30min at 37°C (Darzynkiewicz, Bruno et al. 1992). Propidium iodide (PI) (10 μ g/ml) was added to stain necrotic cells. Forward and side scatters were used to establish size gates and exclude cellular debris from the analysis. JC-1 emission was collected on FL-1 and FL-2 channels at 530 (\pm 20) nm and 590 (\pm 20) nm, respectively. Cells (10,000) were analyzed for each sample in FL-1 and FL-2 channels, after removing PI-stained necrotic cells (FL-3; 620 \pm 15 nm)).

Caspase activity- Following heat treatment, caspase activity was determined as previously described (Stennicke and Salvesen 1997; Bettaieb and Averill-Bates 2005). Cells were lysed at -20°C for 30 min and then caspase-3 substrate Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methyl-coumarin (50 μ M) (Calbiochem, La Jolla, CA) was added. The kinetic reaction for caspase activity was followed at 37°C for 30 min, at respective excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm using a spectrofluorimeter (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Activity of caspase-3 is represented as cumulative fluorescence relative to control cells.

Morphological analysis of apoptosis- Following heat treatment, apoptotic cells were stained with Hoechst 33258 (50 μ g/ml) (blue-green fluorescence) (Sigma) and necrotic cells were stained with PI (50 μ g/ml) (red fluorescence) (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Cells were visualized by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC). For each condition, at least 250 cells were counted. The percentages of apoptotic or necrotic cells were calculated relative to total cells (obtained using bright field illumination).

Cell cycle analysis- Cell cycle analysis was determined by examining the DNA content of cells with PI staining (Cui, Yu et al. 2007). Following HS treatment, cells

were incubated at 37°C for 12h. After fixation in methanol, cells were washed twice with cold PBS and then incubated in RNase solution in PBS (100 U/ml) for 30 min at 37°C. Cells were then incubated in PI solution in PBS (10 µg/ml) overnight at 4°C. Fluorescence was measured by FACScan flow cytometry and analyzed with ModFitLTTM cell cycle analysis program (Becton Dickinson).

Statistics- Data is presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments performed with multiple estimations per point. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups were made by one-way analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ($\alpha = 5\%$). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Differences were considered significant at a P value of < 0.05.

RESULTS

Hyperthermia increases ROS generation: Exposure to HS (42 to 45°C) caused a significant increase in levels of pro-oxidants in HeLa cells, compared to controls at 37°C (Figure 1A,1E). The increase in ROS generation was inhibited when cells were pre-treated with the cell permeable peroxide-detoxifying antioxidant PEG-catalase (Figure 1B,1E), which increases intracellular levels of catalase (Lord-Fontaine and Averill-Bates 2002). Furthermore, there was significant inhibition of HS-induced generation of ROS in thermotolerant cells, compared to non-thermotolerant cells (Figure 1C,1E). It has been reported that ROS can act both upstream and downstream of p53 activation (Kavurma, Figg et al. 2007; Zhao, Zou et al. 2007). However, the complex relationship between p53 and ROS remains a matter of debate. Levels of ROS were not affected when HeLa cells were pre-treated with pifithrin- α , a p53 inhibitor (Figure 1D,1E). These results show that HS increased the generation of ROS, which was not mediated by p53. Subsequently, the ability of ROS to act as an upstream factor in the activation of signalling cascades such as ASK-1/MAPKs and p53, through the death receptor pathway during HS-induced apoptosis, was investigated.

HS induces Daxx translocation to the plasma membrane: The death-associated protein Daxx can mediate apoptosis through death receptors, with subsequent activation of ASK-1 and JNK (Dorion and Landry 2002). During apoptosis, Daxx translocates to the plasma membrane and specifically binds to the death domain of the Fas receptor (Salomoni and Khelifi 2006). We therefore determined whether Daxx could mediate HS-induced activation of the Fas death receptor in HeLa cells. Protein levels of Daxx decreased significantly in the nuclear fraction (Figure 2A-2B) and increased in the cytosolic (Figure 2C-2D) and plasma membrane-rich fractions (Figure 2E-2F) at 42 to 45°C, compared to controls at 37°C. Daxx translocation was inhibited in cells that were pre-treated with PEG-catalase or the Fas antagonist Kp7-6

(Figure 2A-2F). Kp7-6 is an irreversible inhibitor of Fas receptor activation, which prevents Fas ligand from forming a stable complex with the receptor (Hasegawa, Cheng et al. 2004). Purity of subcellular fractions is shown in Figure 2K.

We next investigated whether Daxx is involved in the induction of ASK1 through the Fas receptor during HS-induced apoptosis. Accordingly, ASK-1 protein levels showed a significant increase at 42 to 45°C in the plasma membrane fraction, relative to cells at 37°C (Figure 2G-2H). This increase was markedly reduced by the Fas antagonist and PEG-catalase. Immunoprecipitation with Fas antibody revealed that both Daxx and ASK-1 bind to the Fas receptor in HS-treated (42-45°C) cells (Figure 2I-2J), and this was inhibited by Kp7-6 and PEG-catalase. Moreover, in thermotolerant cells, the relocalisation of Daxx to the plasma membrane, increased expression of ASK-1 and binding of ASK-1 and Daxx to the Fas receptor were all significantly inhibited, compared to non-thermotolerant cells (Figs. 2A-2J). Together, these findings show that HS induces recruitment of Daxx and ASK-1 to bind with Fas receptor at the plasma membrane. These events occurred downstream from ROS generation.

Hyperthermia causes activation of JNK: JNK is a downstream signalling molecule from ASK-1 (Dorion & Landry, 2002 cell Chaperones). We therefore determined whether activation of JNK by HS in HeLa cells could be linked to induction of apoptosis. There was a significant increase in levels of phospho-JNK at 42 to 45°C, compared to controls at 37°C (Figure 3C-3D). Once phosphorylated, JNK enters the nucleus where it phosphorylates c-Jun (Westwick, Weitzel et al. 1995). HS significantly increased phosphorylation of c-Jun (Figure 3G,3H), which also occurred in the nuclear fraction (Figure 3I,3J). We established that increases in phosphorylation of JNK and c-Jun were in fact due to HS, and not to increased levels of protein synthesis or decreased protein degradation, by means of the inhibitors cycloheximide and ALLN, respectively. Fas antagonist and PEG-catalase caused a

partial decline in levels of phospho-JNK (Figure 3C,3D) and phospho-c-Jun (Figure 3G,3H) at elevated temperatures. Cellular levels of JNK (Figure 3A,3B) and c-Jun (Figure 3E,3F) proteins tended to be slightly higher at 42 to 45°C, compared to 37°C. In thermotolerant cells, there was marked inhibition of phosphorylation of JNK (Figure 3C,3D) and c-Jun (Figure 3G-3J). These results show that HS activates the downstream target of ASK-1, JNK and its substrate c-Jun, through processes involving ROS and the Fas receptor.

HS induces JNK-mediated Bax translocation to mitochondria: The mechanism of mitochondrial translocation of pro-apoptotic protein Bax during apoptosis is still unknown. Targeted gene disruption studies have recognized that JNK activation is required for stress-induced release of mitochondrial cytochrome c and apoptosis, and that activated JNK promotes phosphorylation of 14-3-3, a cytoplasmic anchor of Bax. Phosphorylation of 14-3-3 leads to its dissociation from Bax, thus allowing Bax translocation to mitochondria (Okuno, Saito et al. 2004; Tsuruta, Sunayama et al. 2004). We therefore determined whether JNK could mediate Bax translocation in HS cells. Hyperthermia (42-45°C) caused translocation of Bax from the cytosol (Figure 4A,4B) to mitochondria (Figure 4C,4D), compared to controls at 37°C. Indeed, HS-induced mitochondrial Bax translocation was significantly inhibited by a JNK inhibitor SP600125, whereas PEG-catalase and Kp7-6 only had a small effect (Figure 4). In thermotolerant cells, there was significant inhibition of Bax translocation (Figure 4). p53 can function as a transcriptional activator of the *bax* gene (Miyashita, Krajewski et al. 1994). However, p53 did not mediate translocation of Bax protein in heat-treated cells, since the p53 inhibitor pifithrin- α had no effect on this process (Figure 4).

We subsequently evaluated whether JNK could also interact with the anti-apoptotic protein Bcl-2. HS (42-45°C) caused degradation of anti-apoptotic protein Bcl-2 (Figure 10), but this was not mediated by JNK, since JNK inhibition had no

effect (data not shown). These data show that JNK activation promotes HS-induced mitochondrial Bax translocation, by a process which occurs independently of Fas activation, p53 and ROS generation.

JNK mediates hyperthermia-induced post-mitochondrial apoptotic events: HS (42-45°C) induced a loss of MMP (Figure 5A) and liberation of cytochrome c from mitochondria (Figure 5B,5C) into the cytosol (Figure 5D,5E), compared to controls at 37°C. These changes were mediated by JNK, since there was pronounced inhibition by SP600125. Furthermore, HS caused downstream events in the apoptotic cascade, such as activation of caspase-3 (Figure 6), and chromatin condensation in the nucleus (Figure 7A,7B), which were partially inhibited by the JNK inhibitor. Moreover, there was a gradual increase in cell death by necrosis from 42 to 45°C, which was also partially reduced by JNK inhibition (Figure 7C). The higher levels of caspase-3 activation and chromatin condensation at 42 and 43°C, compared to 45°C, are likely explained by the higher levels of necrosis at 45°C, indicating a switch from apoptotic to necrotic cell death at the higher temperature. However, the HS-induced loss of MMP (Figure 5A) and cytochrome c release (Figure 5B-5E) were not inhibited by PEG-catalase or the Fas antagonist. In addition, PEG-catalase did not inhibit caspase-3 activation (Figure 6) and chromatin condensation (Figure 7B). In thermotolerant cells, there was significant inhibition of hyperthermia-induced cytochrome c release (Figure 5), caspase-3 activation (Figure 6), chromatin condensation and necrosis (Figure 7). Furthermore, there was a hyperpolarisation of mitochondrial membranes, compared to non-thermotolerant cells (Figure 5A). Together, these data show that JNK activation promotes HS-induced post-mitochondrial apoptotic events, which occur independently of ROS generation and Fas activation. SP600125 causes only partial inhibition of mitochondrial apoptosis, which suggests that other simultaneous mechanisms are also involved.

Hyperthermia causes activation of p38: Besides JNK, p38 MAPK is also a downstream target of ASK-1, which can be activated by hyperthermia (Dorion, Berube et al. 1999; Dorion, Lambert et al. 2002). We therefore investigated whether p38 activation by hyperthermia could be linked to apoptosis mediated through the Fas death receptor. HS caused a significant increase in levels of phosphorylated p38 in HeLa cells, compared to controls at 37°C (Figure 8C,8D). Pre-treatment of cells with ALLN and cycloheximide did not affect levels of phospho-p38, indicating that increased p38 phosphorylation was due to hyperthermia (Figure 8A,8C). When cells were pre-treated with Fas antagonist or PEG-catalase, levels of phospho-p38 decreased significantly at 42 to 45°C (Figure 8C,8D). Cellular levels of p38 (Figure 8A,8B) protein tended to be slightly higher at 43 to 45°C, compared to 37°C.

p38 is localised in the cytosol and nucleus before activation and appears to be responsible for activation of transcription in both of these compartments under conditions of stress (Ben-Levy, Hooper et al. 1998). Nuclear transport of p38 is critical for the cellular response to stress. Accordingly, levels of p38 and phospho-p38 proteins both increased in the nucleus during HS (Figure 8E-8H). These increases were partially reduced by Fas antagonist and PEG-catalase (Figure 8E-8H). In thermotolerant cells, there was a significant decrease in HS-induced p38 phosphorylation (Fig 8C-8D) and nuclear translocation (Figure 8E-8H). Together, these findings show that HS causes activation and nuclear relocalisation of p38, which occurs downstream of ROS generation and Fas activation.

p38 mediates hyperthermia-induced HSP27 phosphorylation and relocalization:

Activation of p38 MAPK leads to phosphorylation of HSP27 (Dorion, Berube et al. 1999). The levels of HSP27 protein (Figure 9A,9B) and its phosphorylated form (Figure 9C,9D) were significantly increased in cells after HS (42 to 45°C), compared to controls at 37°C. Cycloheximide inhibited the increase in HSP27 expression (Figure 9A), which indicates that HS increases HSP27 protein synthesis.

Cycloheximide did not inhibit the increase in levels of phospho-HSP27, which was attributed to HS (Figure 9C). The heat-induced increases in levels of HSP27 and phospho-HSP27 were not affected by ALLN and thus, were not due to decreased proteosomal degradation (Figure 9A,9C). The HS-induced increases in levels of phosphorylated HSP27 were reduced by PEG-catalase, Fas antagonist and p38 inhibitor SB328020 (Figure 9C,9D), whereas HSP27 expression was not affected (Figure 9A,9B). At 37°C, there were significant increases in levels of HSP27 and phospho-HSP27 in thermotolerant cells, compared to non-thermotolerant cells (Figure 9A-9D).

Under conditions of stress, phosphorylation of HSP27 leads to its intracellular redistribution and accumulation in the nucleus (Arrigo and Pauli 1988), where it can interact with denatured or aggregated nuclear proteins. Phosphorylated HSP27 can also interact with Daxx, preventing its interaction with ASK-1 and Fas, hence blocking Daxx-mediated apoptosis (Charette and Landry 2000). Phosphorylated HSP27 can also interact with cytoskeletal proteins and has a role in protecting or stabilizing the actin cytoskeleton, under stress conditions (Huot, Houle et al. 1996; Guay, Lambert et al. 1997). During HS in HeLa cells, expression of HSP27 and phospho-HSP27 was increased in both nuclear (Figure 9E-9H) and microsomal (Figure 9I-9L) fractions. These increases were eliminated by p38 inhibitor SB328020 (Figure 9E-9L). HS-induced increases in HSP27 phosphorylation in nuclear and microsomal fractions were partially inhibited by PEG-catalase and Fas antagonist (Figure 9G-9H,9K-9L). These inhibitors also reduced the increased HSP27 expression in the microsomal (Fig 9I-9J), but not the nuclear fraction (Figure 9E,9F). In thermotolerant cells at 37°C, levels of HSP27 and phospho-HSP27 were elevated in nuclear and membrane fractions, compared to non-thermotolerant cells (Figure 9E-9L). Together, these results show that HS leads to p38-mediated activation of HSP-27 and its relocalisation to the nucleus and membrane, which occurs downstream of Fas receptor activation and ROS generation.

HS-induced p38 activation leads to Bcl-2 degradation: It has been reported that p38 can act as an inhibitor of Bcl-2 by promoting its degradation during apoptosis (De Chiara, Marcocci et al. 2006; Haddad 2007; Kralova, Dvorak et al. 2007). We therefore determined whether p38 activation could mediate Bcl-2 degradation in hyperthermia-treated cells. Indeed, Bcl-2 protein degradation at 42-45°C was prevented by p38 inhibitor SB328020, Fas antagonist, PEG-catalase and by mild thermotolerance (Figure 10A,10B). These results demonstrate that HS-induced Bcl-2 degradation is mediated by p38 MAPK and is dependent on Fas activation and ROS.

Hyperthermia induces activation of p53 through p38 MAPK: Although phosphorylation of p53 appears to play an important role in stabilization and activation of p53 in cells exposed to HS (Ohnishi 2005), the mechanisms involved remain unclear. We therefore investigated possible links between activation of p38 MAPK and p53 protein during HS-induced apoptosis. HS (42-45°C) caused a significant increase in levels of p53 protein (Figure 11A,11B) and its phosphorylated forms at Ser15 (Figure 11C,11D) and Ser46 (Figure 11E,11F), compared to controls at 37°C. The increases in phospho-ser15/ser46 p53 during hyperthermia were not due to increased levels of p53 protein, since ALLN and cycloheximide did not prevent p53 phosphorylation (Figure 11C,11E). The increases in levels of p53 and phospho-p53 were inhibited by the p38 inhibitor SB328020 (Figure 11A-11F), indicating that HS induction and phosphorylation of p53 is mediated by p38 MAPK. The JNK inhibitor had no effect on p53 phosphorylation (data not shown). The increases in levels of p53 and phospho-p53 were partially inhibited by the Fas antagonist, PEG-catalase, and in thermotolerant cells (Figure 11A-11F). These findings show that hyperthermia-induced p53 activation is mediated by p38 MAPK and lies downstream of ROS generation and Fas activation.

p53 mediates HS-induced activation of the mitochondrial pathway. Activation of p53 upon challenge with several stresses leads to its relocalization to mitochondria and to the nucleus (Meulmeester and Jochemsen 2008). Hence, p53 is able to induce the mitochondrial pathway of apoptosis independently of its transcriptional activity in the nucleus. It was proposed that p53 acts in a similar way to BH3-only proteins by directly inducing permeabilization of the outer mitochondrial membrane. p53 was shown to interact with and activate Bax and Bak proteins (Chipuk and Green 2004; Leu, Dumont et al. 2004), or with Bcl-2 and/or Bcl-xL proteins to inhibit their anti-apoptotic activity (Mihara, Erster et al. 2003; Mihara and Moll 2003). We therefore investigated whether HS can cause translocation of p53 to mitochondria. Indeed, HS caused an increase in p53 (Figure 11G-11H) and ser15-p53 in mitochondria (Figure 11I-11J), which was inhibited by the p38 inhibitor SB328020, Fas antagonist, PEG-catalase, as well as in thermotolerant cells (Figure 11G-11J).

Subsequently, cell lysates were subjected to immunoprecipitation using a p53 antibody to examine the interactions that might occur between p53 protein and members of Bcl-2 family (Figure 12A). Bcl-2 and Bcl-xL proteins, but not Bax or Bak, were co-immunoprecipitated with p53 as a function of temperature (Figure 12A). These results indicate that p53 protein sensitizes cells to mitochondria-mediated apoptosis during heat shock by forming complexes that inhibit the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL. Surprisingly, inhibition of p53 and p38 had little effect on HS-induced loss of MMP (Figure 12B) and cytochrome c release (Figure 12C-12F). However, inhibition of p38 and p53 caused a partial decrease in HS-induced activation of caspase-3 (42-43°C) (Figure 12G), chromatin condensation (42-45°C) (Figure 12H) and necrosis (Figure 12I). Together, these results show that HS leads to p38-mediated activation of p53 protein and its relocalisation to mitochondria, where it causes a pro-apoptotic imbalance, by processes which occur downstream of ROS generation and Fas receptor. However, there appear to be alternative mechanisms, which are independent of p53 and p38 proteins, which are also involved in activation

of the mitochondrial pathway during heat shock. This is likely explained by parallel JNK-mediated activation of the mitochondrial pathway during heat shock.

HS induces transcriptional activity of p53

HS also caused nuclear translocation of p53 (Figure 11K-11L) and phospho-p53 proteins (Figure 11M-11N). These increases were inhibited by the p53 inhibitor, Fas antagonist, PEG-catalase, and in thermotolerant cells (Figure 11K-11M). To determine whether HS-induced activation of p53 is correlated with its transcriptional activity, we measured protein expression of some of its target genes, FasL, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Puma and Noxa (Figure 13). Hyperthermia caused an increase in protein levels of FasL (Figure 13A, 13D), and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, Puma, Noxa and Bax (Figure 13E-13J). There was a corresponding decrease in levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2 (Figure 13K-13N). These increases were completely inhibited by the p53 inhibitor pifithrin- α (Figure 13B, 13D-13L). However, Bcl-2 degradation was not mediated by p53, since pifithrin- α had no effect (Fig 13M-13N). HS-induced changes in expression of FasL, Puma, Noxa, Bax, Bcl-xL and Bcl-2 were also reduced in thermotolerant cells (Figure 13C-13N). These results show that HS-induced p53 activation leads to an imbalance between levels of expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins involved in the Fas death receptor and mitochondrial pathways, which could sensitize cells to apoptosis.

HS induces cell cycle arrest: The phosphorylation of p53 protein and its accumulation in the nucleus is thought to play a crucial role in the G1/S transition mediated by p21 (Ohnishi, Matsumoto et al. 1995; Ohnishi 2005). To look into the possibility of p53-mediated cell cycle arrest in HS-treated cells, DNA content of cells was analyzed 12h after exposure to HS. There was a temperature-dependent increase in the population of cells with 2n DNA content corresponding to G0/G1, while the S-phase cell population (DNA content falling between 2n and 4n) decreased (Figure

14A). Furthermore, the G1 peak of HS-treated cells displayed a shift in DNA content, indicating an abnormal aneuploid DNA content in these cells. Collectively, this suggests that cells were possibly arrested at the G1/S boundary, and DNA replication was blocked at an early stage of S-phase by the HS treatment. When cells were treated with inhibitors of p53, p38, ROS or Fas activation, cell cycle arrest at G1/S during HS was reversed (Figure 14B). The blockade of cell cycle progression at the G1/S checkpoint was lower in thermotolerant cells, compared to non-thermotolerant cells (Figure 14B). These findings suggest that the effect of HS on cell cycle progression at the G1/S checkpoint was dependent on p53 activity, which is downstream of ROS, Fas activation and p38 MAPK activation.

DISCUSSION

The mechanisms leading to heat shock-induced cell death are not entirely understood and remain the subject of intense investigation. The present study establishes the involvement of ROS and the Fas death receptor as upstream mediators in hyperthermia-induced apoptosis in human HeLa adenocarcinoma cells. Our findings show that hyperthermia (42-45°C) increases generation of ROS, which play a role in the induction of apoptosis. The inhibitory effects of the antioxidant PEG-catalase confirm that ROS are upstream mediators in activation of the Fas death receptor pathway, which subsequently leads to activation of ASK1, JNK and p38 MAPKs, as well as p53.

Earlier studies reported that heat increased oxidative stress in Chinese hamster ovary (CHO), MCF-7 breast carcinoma, rat intestinal epithelial, PC-3 prostate and HL-60 leukemia cells (Li and Oberley 1997; Flanagan, Moseley et al. 1998; Moriyama-Gonda, Igawa et al. 2002; Katschinski et al., 2000) and in aged rats (Zhang, Xu et al. 2003). However, the detailed mechanisms by which heat shock increases ROS accumulation remain undetermined. Heat shock can increase the reactivity of ROS such as H₂O₂ and caused a redox imbalance in cells by decreasing the GSH/GSSG ratio (Lord-Fontaine and Averill 1999; Lord-Fontaine and Averill-Bates 2002). The major intracellular source of ROS is the respiratory chain in mitochondria (Ott, Gogvadze et al. 2007). Since increased temperatures are known to increase reaction rates, hyperthermia is likely to increase the formation of superoxide by the mitochondrial electron transport chain. Superoxide is subsequently converted to hydrogen peroxide, which is able to diffuse out of mitochondria. Mitochondrial-derived ROS could then induce expression of Fas ligand and initiate death receptor signalling (Petak and Houghton 2001). Other potential intracellular sources of ROS include NADPH oxidase and xanthine oxidase, whose activities were increased by 44°C hyperthermia in keratinocyte HaCaT cells (Shin, Moon et al. 2008).

Our findings show that hyperthermia increases ROS generation in HeLa cells, notably hydrogen peroxide, and that ROS are initiating factors in the activation of apoptosis.

Heat-induced ROS generation was partially decreased by mild thermotolerance developed at a non-lethal fever temperature of 40°C. Mild thermotolerance increased synthesis of HSPs 27, 32, 70, 90 and 110 in CHO and HeLa cells (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Overexpression of different HSPs has been shown to induce a survival response. The partial protective effects of mild thermotolerance against increased ROS generation could be explained by the antioxidant effects of HSP27 (Huot, Houle et al. 1996) and HSP70 (Guo, Wharton et al. 2007). In addition, overexpression of HSP27 can inhibit oxidative stress-induced cellular damage by increasing levels of cellular glutathione (Mehlen, Schulze-Osthoff et al. 1996; McCollum, Teneyck et al. 2006).

Daxx is as an alternate adapter of the Fas receptor, which is capable of mediating Fas-induced apoptosis through a distinct pathway from that mediated by FADD, the other Fas adapter. Moreover, our immunoprecipitation data showed that hyperthermia caused translocation of Daxx to the plasma membrane, where it formed a complex with Fas and ASK-1, resulting in ASK-1 activation. This is an important observation in the sense that heat shock-induced cell death appears to be mediated by several pathways. There are several reports on the interaction between HSPs and the Daxx machinery. Phosphorylated HSP27 can interact with Daxx and inhibit its translocation from the nucleus to the cytoplasm, thus preventing its interaction with ASK-1 and Fas, and blocking Daxx-mediated apoptosis (Charette and Landry 2000; Charette, Lavoie et al. 2000). Our findings show that mild thermotolerance decreased heat shock-induced Daxx translocation and ASK-1 activation, which could be attributed to HSP27.

In the present work, hyperthermia activated JNK MAPK, which was partially mediated by ROS and ASK-1. Subsequently, JNK induced mitochondrial Bax translocation and activation of the mitochondrial pathway, which were not dependent

on ROS and Fas activation. Our findings indicate that hyperthermia can also activate JNK simultaneously through (an) alternate mechanism(s). Previous studies showed that activation of JNK by protein-damaging treatments such as heat shock is due mainly to inhibition of JNK phosphatases, which leads to phospho-JNK accumulation (Meriin, Yaglom et al. 1999; Nguyen and Shiozaki 1999). Such a mechanism could explain why scavenging of ROS did not prevent Bax translocation to mitochondria or the activation of mitochondrial apoptosis. Alternatively, receptor-interacting protein 1 (RIP1) kinase can translocate to mitochondria, leading to JNK activation, which may trigger the mitochondrial pathway by a mechanism that is not dependent on death receptor activation through FADD:caspase 8 or Daxx:ASK-1 interactions (Temkin and Karin 2007). In addition, it has been proposed that heat shock-induced activation of JNK may be mediated by a signal pathway involving the genistein-sensitive tyrosine kinase (GTK), a member of the c-Src family (Han, Ha et al. 2000).

Heat shock led to activation and nuclear translocation of c-Jun, a target of JNK. c-Jun is a major component of the mammalian transcription factor, activator protein-1 (AP-1) (Shaulian and Karin 2001). c-Jun is able to regulate AP-1 target genes involved in cell proliferation and apoptosis, such as FasL, cyclin D1, p53, p21, p19 and p16. Thus, c-Jun is able to induce both growth-promoting activity and apoptosis. Indeed, c-Jun appears to be an important mediator of pro-apoptotic effects of persistent JNK activation, particularly in response to stress and genotoxics (Shaulian and Karin 2001).

Mild thermotolerance induced at 40°C suppressed heat shock-induced JNK activation and Bax translocation in HeLa cells. This is likely to be attributed to HSP72, the inducible form of HSP70. Indeed, suppression of JNK activation has been attributed to HSP72 in several studies (Buzzard, Giaccia et al. 1998; Gabai, Mabuchi et al. 2002) and the mechanism appears to involve direct binding of HSP72 to JNK (Park et al 2001). HSP72 can also prevent cell death by suppressing JNK phosphorylation either directly and/or through the upstream kinase SEK (Mosser,

Caron et al. 1997; Volloch, Mosser et al. 1998; Meriin, Yaglom et al. 1999; Mosser, Caron et al. 2000). Elevation of HSP72 levels inhibited repression of JNK dephosphorylation by heat shock (Meriin, Yaglom et al. 1999). These data indicate that a JNK phosphatase could be a target for regulation by HSP72. In heat shocked human acute lymphoblastic T cells, HSP70 prevented mitochondrial outer membrane permeabilization by blocking Bax translocation (Stankiewicz, Lachapelle et al. 2005). It was suggested that the inhibition of JNK activity could therefore be a factor of acquired thermotolerance (Dorion and Landry 2002).

The present study shows that hyperthermia activates p38 MAPK and causes its nuclear translocation. It was reported that activation of the p38 signalling pathway by heat shock involves the dissociation of ASK-1 from the inhibitor glutathione S-transferase Mu1-1 (Dorion, Lambert et al. 2002). In HeLa cells, hyperthermia also caused p38-dependent activation of HSP27 and its translocation to membranes and nuclei, as well as Bcl-2 degradation and p53 activation. These changes all occurred downstream of ROS generation and Fas activation. The phosphorylation of HSP27 was shown to have a protective function against actin disruption in the cytoskeleton during oxidative stress and heat shock (Guay, Lambert et al. 1997). However, HSP27 phosphorylation can also mediate inappropriate actin polymerization activity, which leads to cell membrane blebbing and apoptosis, particularly in response to toxic insults (Dorion and Landry 2002). It was suggested that nuclear translocation of HSP27 during stress is required for the disaggregation of nuclear proteins that were denatured and aggregated by hyperthermia (Borrelli, Bernock et al. 2002).

Hyperthermia-mediated activation of p38 and HSP27, and Bcl-2 degradation were diminished by mild thermotolerance. It was reported that p38 activity is decreased when the level of HSP72 is increased (Gabai, Meriin et al. 1997), or after thermotolerance induced at 44°C during 20 min (Dorion, Berube et al. 1999). These data suggest that in the regulation of JNK and p38 MAPKs, HSP70 serves as a "sensor" of the build-up of abnormal proteins after heat shock and other stresses.

Hyperthermia caused activation of p53, which was mediated by p38. p53 protein was translocated to mitochondria, which suggests that apart from its transcriptional activity, it plays a role in sensitizing cells to the intrinsic pathway of apoptosis. It was proposed that p53, like BH3-only proteins, directly induces permeabilization of the outer mitochondrial membrane by forming inhibitory complexes with anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins or by disrupting the Bak-Mcl1 complex (Mihara, Erster et al. 2003; Mihara and Moll 2003; Nair, McNaught et al. 2006). Dissociation of Bak from a Bak-Mcl1 complex leads to its oligomerization and release of cytochrome c (Dumont, Della Pietra et al. 2003; Leu, Dumont et al. 2004). In a similar manner, p53 interacts with Bax and causes its activation (Chipuk and Green 2004).

Moreover, cell cycle progression analysis showed that lethal heat shock induced cell cycle arrest at G1/S phase in HeLa cells. Cell cycle arrest was attributed in part, to ROS generation and activation and nuclear accumulation of p53. The use of pharmacological inhibitors confirmed that p53 activation and cell cycle arrest originated from Fas receptor signalling and activation of p38 MAPK. Several studies reported that acute exposure to heat shock led to transient cell cycle arrest, mainly at G1/S and G2/M phases (Fuse, Yamada et al. 1996; Ohnishi, Wang et al. 1996; Nitta, Okamura et al. 1997; Miyakoda, Nakahata et al. 1999; Miyakoda, Suzuki et al. 2002; Wang and Chen 2003). Cell cycle arrest at G1/S was dependent on p53 in several normal human cell types (Nitta, Okamura et al. 1997; Miyakoda, Nakahata et al. 1999; Miyakoda, Suzuki et al. 2002). However, in human glioblastoma cell lines, heat shock induced a transient p21-dependent cell cycle arrest at G1/S that was independent of p53 (Fuse, Yamada et al. 1996). Several studies observed cell cycle arrest in normal cells under conditions which did not cause cell cycle arrest in tumor cells (Nitta, Okamura et al. 1997; Miyakoda, Nakahata et al. 1999). These findings could be explained by inherent resistance of cancer cells to stress-induced toxicity and a multitude of differences between normal and cancer cells in terms of expression of defence proteins such as p53 and HSPs. Shorter heat exposures of 45 min and 2h at

43°C did not cause cell cycle arrest in HeLa cells (data not shown) (Nitta, Okamura et al. 1997; Miyakoda, Nakahata et al. 1999), whereas in our study, a longer heat exposure of 3h was able to induce p53 activation and cell cycle block (Fuse, Yamada et al. 1996; Ohnishi, Wang et al. 1996; Nitta, Okamura et al. 1997; Miyakoda, Nakahata et al. 1999; Miyakoda, Suzuki et al. 2002; Wang and Chen 2003) Taken together, hyperthermia-induced cell cycle arrest is dependent on cell type and the strength and duration of heat shock treatment (Park, Han et al. 2005).

Although our results did not demonstrate a direct protective effect of HSPs on heat-shock induced apoptosis, it is interesting to note that thermotolerance induced at mild temperature (40°C) protected against activation of the MAPK signalling pathway, as well as p53 activation. The mechanism(s) involved in the partial reversal of cell cycle arrest by mild thermotolerance in HeLa cells is not presently understood. Possible mechanisms include sequestration of p53 by HSPs (Matsumoto, Wang et al. 1995). Several reports showed that p53 forms complexes with some members of the HSP70 family (Sturzbecher, Chumakov et al. 1987; Ohnishi, Matsumoto et al. 1995). HSPs could bind to p53 and consequently could not only regulate p53 accumulation or localization, but also modulate its biological effects. It was reported that depletion of HSP27 or HSP72 (Wadhwa, Sugihara et al. 2000; Yaglom, Gabai et al. 2007) led to strong activation of p53, induction of p21, cell cycle arrest at both G1 and G2 phases. HSP90 and its co-chaperones also could transiently associate with key molecules of the cell cycle regulating systems, including p53, Cdk4, Wee-1, c-Myc, pRb and p27/Kip1 (Helmbrecht, Zeise et al. 2000; Jolly and Morimoto 2000; Zyllicz, King et al. 2001).

In conclusion, our findings show that hyperthermia induces the alternate death receptor pathway involving Daxx and ASK-1, which leads to activation of p38 and JNK MAPKs. Activation of JNK and p38 MAPKs was linked to hyperthermia-induced apoptosis. Heat shock also caused p38-mediated activation of p53, which led to cell cycle arrest at G1/S phase. Moreover, translocation of p53 to mitochondria

suggests that this protein may mediate apoptosis by mechanisms that are both dependent and independent of its transcriptional activity. However, translocation of Bax to mitochondria and cytochrome c release were dependent on JNK activation. Together, these results show that ROS generation is an upstream factor which plays a central role in HS-induced apoptosis in HeLa adenocarcinoma cells, by mediating activation of p38 and JNK MAPKs, as well as p53. Mild thermotolerance induced at a fever temperature of 40°C afforded wide ranging protective effects against hyperthermia-induced apoptosis at the upstream level and through both the death receptor and mitochondrial pathways.

Acknowledgements: This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We are grateful to Paulina K. Wrzal for assistance.

REFERENCES

- Arrigo, A. P. and D. Pauli (1988). "Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during *Drosophila* development." Exp Cell Res **175**(1): 169-83.
- Babbs, C. F. and D. P. DeWitt (1981). "Physical principles of local heat therapy for cancer." Med Instrum **15**(6): 367-73.
- Beere, H. M. (2004). ""The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis." J Cell Sci **117**(Pt 13): 2641-51.
- Ben-Levy, R., S. Hooper, et al. (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Curr Biol **8**(19): 1049-57.
- Bettaieb, A. and D. A. Averill-Bates (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol **205**(1): 47-57.
- Borrelli, M. J., L. J. Bernock, et al. (2002). "Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation." Cell Stress Chaperones **7**(3): 281-96.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Buzzard, K. A., A. J. Giaccia, et al. (1998). "Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis." J Biol Chem **273**(27): 17147-53.
- Chang, H. Y., H. Nishitoh, et al. (1998). "Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx." Science **281**(5384): 1860-3.
- Charette, S. J. and J. Landry (2000). "The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis." Ann N Y Acad Sci **926**: 126-31.

- Charette, S. J., J. N. Lavoie, et al. (2000). "Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27." Mol Cell Biol **20**(20): 7602-12.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2004). "Cytoplasmic p53: bax and forward." Cell Cycle **3**(4): 429-31.
- Chouinard, N., K. Valerie, et al. (2002). "UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53." Biochem J **365**(Pt 1): 133-45.
- Cui, Q., J. H. Yu, et al. (2007). "P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3- independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells." Acta Pharmacol Sin **28**(7): 1057-66.
- Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, et al. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." Cytometry **13**(8): 795-808.
- De Chiara, G., M. E. Marcocci, et al. (2006). "Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences." J Biol Chem **281**(30): 21353-61.
- Dorion, S., J. Berube, et al. (1999). "A short lived protein involved in the heat shock sensing mechanism responsible for stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) activation." J Biol Chem **274**(53): 37591-7.
- Dorion, S., H. Lambert, et al. (2002). "Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1." J Biol Chem **277**(34): 30792-7.
- Dorion, S. and J. Landry (2002). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock." Cell Stress Chaperones **7**(2): 200-6.
- Dumont, P., A. Della Pietra, et al. (2003). "Methods to study p53-repressed promoters." Methods Mol Biol **234**: 111-20.
- Field, S. B. and R. L. Anderson (1982). "Thermotolerance: a review of observations and possible mechanisms." Natl Cancer Inst Monogr **61**: 193-201.

- Flanagan, S. W., P. L. Moseley, et al. (1998). "Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping." FEBS Lett **431**(2): 285-6.
- Fujisawa, T., K. Takeda, et al. (2007). "ASK family proteins in stress response and disease." Mol Biotechnol **37**(1): 13-8.
- Fuse, T., K. Yamada, et al. (1996). "Heat shock-mediated cell cycle arrest is accompanied by induction of p21 CKI." Biochem Biophys Res Commun **225**(3): 759-63.
- Gabai, V. L., K. Mabuchi, et al. (2002). "Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis." Mol Cell Biol **22**(10): 3415-24.
- Gabai, V. L., A. B. Meriin, et al. (1997). "Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance." J Biol Chem **272**(29): 18033-7.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." J Cell Sci **110 (Pt 3)**: 357-68.
- Guo, S., W. Wharton, et al. (2007). "Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities." Cell Stress Chaperones **12**(3): 245-54.
- Haddad, J. J. (2007). "The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK(ERK): discordant proteomic effect of MAPK(p38)." Protein Pept Lett **14**(4): 361-71.
- Han, S. I., K. S. Ha, et al. (2000). "Heat shock-induced actin polymerization, SAPK/JNK activation, and heat-shock protein expression are mediated by genistein-sensitive tyrosine kinase(s) in K562 cells." Cell Biol Int **24**(7): 447-57.

- Hasegawa, A., X. Cheng, et al. (2004). "Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6599-604.
- Helmbrecht, K., E. Zeise, et al. (2000). "Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review." Cell Prolif **33**(6): 341-65.
- Hildebrandt, B., P. Wust, et al. (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Crit Rev Oncol Hematol **43**(1): 33-56.
- Horsman, M. R. and J. Overgaard (2007). "Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(6): 418-26.
- Huang, C., W. Y. Ma, et al. (1999). "p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389." J Biol Chem **274**(18): 12229-35.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." Cancer Res **56**(2): 273-9.
- Jolly, C. and R. I. Morimoto (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." J Natl Cancer Inst **92**(19): 1564-72.
- Kavurma, M. M., N. Figg, et al. (2007). "Oxidative stress regulates IGF1R expression in vascular smooth-muscle cells via p53 and HDAC recruitment." Biochem J **407**(1): 79-87.
- Klostergaard, J., M. E. Leroux, et al. (2006). "Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cells." J Cell Biochem **98**(2): 356-69.
- Kralova, J., M. Dvorak, et al. (2007). "p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative." Oncogene.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Landry, J., D. Bernier, et al. (1982). "Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance." Cancer Res **42**(6): 2457-61.
- Lepock, J. R. (2004). "Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization." Int J Hyperthermia **20**(2): 115-30.
- Leu, J. I., P. Dumont, et al. (2004). "Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex." Nat Cell Biol **6**(5): 443-50.
- Li, J. J. and L. W. Oberley (1997). "Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia." Cancer Res **57**(10): 1991-8.
- Liu, J. and A. Lin (2005). "Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword." Cell Res **15**(1): 36-42.
- Lord-Fontaine, S. and D. A. Averill-Bates (2002). "Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose." Free Radic Biol Med **32**(8): 752-65.
- Lord-Fontaine, S. and D. A. Averill (1999). "Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses." Arch Biochem Biophys **363**(2): 283-95.
- Matsumoto, H., X. Wang, et al. (1995). "Binding between wild-type p53 and hsp72 accumulated after UV and gamma-ray irradiation." Cancer Lett **92**(2): 127-33.
- Matsuzawa, A. and H. Ichijo (2008). "Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling." Biochim Biophys Acta.
- McCollum, A. K., C. J. Teneyck, et al. (2006). "Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism." Cancer Res **66**(22): 10967-75.

- Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, et al. (1996). "Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death." J Biol Chem **271**(28): 16510-4.
- Meriin, A. B., J. A. Yaglom, et al. (1999). "Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72." Mol Cell Biol **19**(4): 2547-55.
- Meulmeester, E. and A. G. Jochemsen (2008). "p53: a guide to apoptosis." Curr Cancer Drug Targets **8**(2): 87-97.
- Mihara, M., S. Erster, et al. (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**(3): 577-90.
- Mihara, M. and U. M. Moll (2003). "Detection of mitochondrial localization of p53." Methods Mol Biol **234**: 203-9.
- Mirkes, P. E. and S. A. Little (2000). "Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine." Toxicol Appl Pharmacol **162**(3): 197-206.
- Miyakoda, M., K. Nakahata, et al. (1999). "Heat-induced G1 arrest is dependent on p53 function but not on RB dephosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **266**(2): 377-81.
- Miyakoda, M., K. Suzuki, et al. (2002). "Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock." Oncogene **21**(7): 1090-6.
- Miyashita, T., S. Krajewski, et al. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." Oncogene **9**(6): 1799-805.
- Moriyama-Gonda, N., M. Igawa, et al. (2002). "Modulation of heat-induced cell death in PC-3 prostate cancer cells by the antioxidant inhibitor diethyldithiocarbamate." BJU Int **90**(3): 317-25.

- Mosser, D. D., A. W. Caron, et al. (1997). "Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **17**(9): 5317-27.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, et al. (2000). "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **20**(19): 7146-59.
- Nair, V. D., K. S. McNaught, et al. (2006). "p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition." J Biol Chem **281**(51): 39550-60.
- Nguyen, A. N. and K. Shiozaki (1999). "Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases." Genes Dev **13**(13): 1653-63.
- Nitta, M., H. Okamura, et al. (1997). "Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S." Oncogene **15**(5): 561-8.
- Ohnishi, T. (2005). "The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia." J Cancer Res Ther **1**(3): 147-50.
- Ohnishi, T., H. Matsumoto, et al. (1995). "Accumulation of mutant p53 and hsp72 by heat treatment, and their association in a human glioblastoma cell line." Int J Hyperthermia **11**(5): 663-71.
- Ohnishi, T., X. Wang, et al. (1996). "p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells." J Biol Chem **271**(24): 14510-3.
- Okuno, S., A. Saito, et al. (2004). "The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia." J Neurosci **24**(36): 7879-87.
- Ott, M., V. Gogvadze, et al. (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." Apoptosis **12**(5): 913-22.

- Park, H. G., S. I. Han, et al. (2005). "Cellular responses to mild heat stress." Cell Mol Life Sci **62**(1): 10-23.
- Petak, I. and J. A. Houghton (2001). "Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy." Pathol Oncol Res **7**(2): 95-106.
- Przybytkowski, E., J. H. Bates, et al. (1986). "Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins." Radiat Res **107**(3): 317-31.
- Salomoni, P. and A. F. Khelifi (2006). "Daxx: death or survival protein?" Trends Cell Biol **16**(2): 97-104.
- Samali, A., J. Cai, et al. (1999). "Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells." Embo J **18**(8): 2040-8.
- Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." Oncogene **20**(19): 2390-400.
- Shin, M. H., Y. J. Moon, et al. (2008). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression." Free Radic Biol Med **44**(4): 635-45.
- Stankiewicz, A. R., G. Lachapelle, et al. (2005). "Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation." J Biol Chem **280**(46): 38729-39.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1997). "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8." J Biol Chem **272**(41): 25719-23.
- Sturzbecher, H. W., P. Chumakov, et al. (1987). "Mutant p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock-related proteins in SV40-transformed monkey cells." Oncogene **1**(2): 201-11.
- Subjeck, J. R., J. J. Sciandra, et al. (1982). "Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics." Br J Radiol **55**(656): 579-84.

- Temkin, V. and M. Karin (2007). "From death receptor to reactive oxygen species and c-Jun N-terminal protein kinase: the receptor-interacting protein 1 odyssey." Immunol Rev **220**: 8-21.
- Tsuruta, F., J. Sunayama, et al. (2004). "JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins." Embo J **23**(8): 1889-99.
- van der Zee, J. (2002). "Heating the patient: a promising approach?" Ann Oncol **13**(8): 1173-84.
- Volloch, V., D. D. Mosser, et al. (1998). "Reduced thermotolerance in aged cells results from a loss of an hsp72-mediated control of JNK signaling pathway." Cell Stress Chaperones **3**(4): 265-71.
- Wadhwa, R., T. Sugihara, et al. (2000). "Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function." Cancer Res **60**(24): 6818-21.
- Wang, C. and J. Chen (2003). "Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53." J Biol Chem **278**(3): 2066-71.
- Westwick, J. K., C. Weitzel, et al. (1995). "Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration." J Clin Invest **95**(2): 803-10.
- Yaglom, J. A., V. L. Gabai, et al. (2007). "High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways." Cancer Res **67**(5): 2373-81.
- Yang, C. S., H. M. Lee, et al. (2007). "Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia." J Neuroinflammation **4**: 27.
- Zhang, H. J., L. Xu, et al. (2003). "Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation." Faseb J **17**(15): 2293-5.

- Zhao, D. L., L. B. Zou, et al. (2007). "Anti-apoptotic effect of esculin on dopamine-induced cytotoxicity in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line." Neuropharmacology **53**(6): 724-32.
- Zylicz, M., F. W. King, et al. (2001). "Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein." Embo J **20**(17): 4634-8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: HS increases ROS generation. Non-thermotolerant cells, alone (A), or pre-treated with PEG-catalase (C) or PFT- α (D), and thermotolerant (B) cells were heated (3h, 42-45°C) and then labelled with H₂DCF-DA for 30min. Cells (10,000) were analysed by flow cytometry (FL1). H₂DCF-DA fluorescence is shown relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments: P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), for HS versus 37°C. P < 0.05 (#), P < 0.01 (##) for, with or without inhibitor, at each temperature.

Figure 2: Hyperthermia induces Daxx translocation from the nucleus to the plasma membrane. Non-thermotolerant cells, with or without pre-treatment for 3h with PEG-catalase or Fas antagonist Kp7-6 (FasAg), and thermotolerant cells, were exposed to HS (3h, 42-45°C). Representative blots are shown for protein levels of Daxx (120kDa) in nuclear (A, B), cytosolic (C,D) and membrane (E,F) fractions, and ASK-1 (165kDa) in membrane fractions (G,H), which are expressed relative to controls at 37°C (100%). Purity of subcellular fractions was verified using antibodies against lamin A (L), cytochrome oxidase (CO), GST π_1 (G), and calnexin (CA), for nuclear (89%), mitochondrial (97%), cytoplasmic (98%) and microsomal fractions (92%), respectively (K). Cells were subjected to immunoprecipitation using anti-Fas antibody and Daxx (I) and ASK-1 (J) were detected by Western blot. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 3: HS activates JNK. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, Fas antagonist, ALLN or cycloheximide. Total cellular expression of JNK (46kDa) (A,B), phospho-JNK (46kDa) (C,D), c-Jun (39kDa) (E,F) and phospho-c-Jun (39kDa) (F,G) proteins, and nuclear levels of phospho-c-Jun (I,J), is expressed relative to controls at 37°C (100%). Data represent

means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 4: Hyperthermia induces JNK-mediated Bax translocation to mitochondria. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, or inhibitors of Fas activation, JNK (SP600125), p53 (PFT α), ALLN or cycloheximide. Expression of Bax (21kDa) protein was immunodetected in cytosolic (A, B) and mitochondrial (C, D) fractions of cells, and is expressed relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 5: HS induces JNK-mediated cytochrome release from mitochondria. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, or inhibitors of Fas activation or JNK (SP600125). MMP (JC-1 fluorescence) was expressed relative to controls at 37°C (A). Expression of cytochrome c (14kDa) protein was immunodetected in mitochondrial (B,C) and cytosolic (D,E) fractions of cells, and is expressed relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 6: Activation of caspase-3 by hyperthermia. Thermotolerant and non-thermotolerant cells, with or without pre-treatment with a JNK inhibitor, were exposed to HS (3h, 42-45°C). Caspase-3 activity is relative to controls at 37°C (1.0). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 7: HS induces chromatin condensation. Thermotolerant and non-thermotolerant cells, with or without pre-treatment for 3h with inhibitors of JNK, p38 or p53, were exposed to HS (3h, 42-45°C). Cells were stained with Hoechst and PI. Magnification: 320X. Fractions of apoptotic (B) and necrotic (C) cells are shown relative to total cells. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 8: Hyperthermia induces p38 activation. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, Fas antagonist, ALLN or cycloheximide. Levels of p38 (A-B, E-F) and phosphorylated p38 (C-D, G-H) proteins were immunodetected in cell lysates (A-D) and in the nucleus (E-H), and are relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 9: HS causes p38-mediated HSP27 activation. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, Kp7-6, p38 inhibitor (SB328020), ALLN or cycloheximide. Expression of HSP27 (A-B, E-F, I-J) and phosphorylated HSP27 (C-D, G-H, K-L) was immunodetected in cell lysates (A-D), nuclear fractions (E-H) and microsomal fractions (I-L), and is relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 10. Hyperthermia induces p38-mediated Bcl-2 degradation. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, Fas antagonist, ALLN, cycloheximide or inhibitor of p38. Levels of Bcl-2 were immunodetected in cell lysates and are expressed relative to untreated controls

at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 11. HS causes p38-mediated p53 activation and translocation.

Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, Fas antagonist, p38 inhibitor, ALLN or cycloheximide. Protein levels of p53 (A-B, G-H,K-L) and p53 phosphorylated at ser¹⁵ (C-D, I-J,M-N) and ser⁴⁶ (E-F) were immunodetected cell lysates (A-F), mitochondrial fractions (G-J) and nuclear fractions (K-N), and are expressed relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 12. p53 causes mitochondrial changes during HS.

Non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C), and where appropriate, they were pre-treated for 3h with PEG-catalase, or inhibitors of p38 or p53. (A) Cells were subjected to immunoprecipitation using p53 monoclonal antibody and Bax, Bak, Bcl-2 or Bcl-xL proteins were detected by Western blot. As a positive control (PC), 20 μ g of whole-cell extract from normal HeLa cells was used. MMP (JC-1 fluorescence) is expressed relative to controls at 37°C (B). Levels of cytochrome c (14kDa) protein were immunodetected in mitochondrial (C,D) and cytosolic (E,F) fractions of cells, and are expressed relative to controls at 37°C (100%). (G) Caspase-3 activity is relative to controls at 37°C (1.0). Fractions of apoptotic (H) and necrotic (I) cells are shown relative to total cells. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 13. Hyperthermia induces transcriptional activity of p53.

Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with p53 inhibitor. Fas ligand expression was evaluated by flow cytometry in non-thermotolerant cells, alone (A,D),

or with inhibitor of p53 (PFT- α) (C,D), and in thermotolerant cells (B,D). Levels of Puma (E-F), Noxa (G-H), Bax (I-J), Bcl-xL (K-L), and Bcl-2 (M-N) proteins were immunodetected and are expressed relative to controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 14: Hyperthermia induces cell cycle arrest at G1/S phase mediated by p38 and p53. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, non-thermotolerant cells were pre-treated for 3h with PEG-catalase, or inhibitors of p53 or p38, or Fas activation. After 12h, cells were stained with PI for cell-cycle analysis by FACS analysis of DNA content. Representative FACScan plots are shown for non-thermotolerant cells exposed to HS (A). The G1/S (B), G₂/M (C) and S (D) ratios were determined with Cell quest and analyzed using ModFit software. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Scheme 1: Role of JNK MAPK in hyperthermia-induced apoptosis in HeLa cells. Exposure to hyperthermia (42-45°C) for 3h increased (1) ROS generation and (2) FasL expression. The recruitment of (3) Daxx and (4) ASK-1 to form a complex with Fas at the plasma membrane resulted in (5) activation of p38 (see Scheme 2) and JNK MAPKs. JNK activation led to (6) phosphorylation of c-Jun and (7) Bax translocation to mitochondria, since these molecular events were inhibited by JNK inhibitor PD98059. There was subsequent activation of the mitochondrial pathway, involving (8) loss of membrane potential ($\Delta\Psi_m$), (9) cytochrome c release, (10) caspase-3 activation and (11) nuclear chromatin condensation. The antioxidant PEG-catalase and Fas/FasL antagonist Kp-7-6 both abrogated the increased (2) expression of FasL and (5) JNK activation in response to heat shock. However, PEG-catalase and the JNK inhibitor did not affect activation of the mitochondrial pathway. The Fas

antagonist partially inhibited mitochondrial apoptosis, indicating that heat can activate this pathway directly and/or by alternate mechanisms.

Scheme 2: Role of p38 MAPK and p53 in hyperthermia-induced cell death in HeLa cells. (1) p38 MAPK was activated and (2) translocated to the nucleus, where it caused (3) phosphorylation of HSP27 and its (4) nuclear and membrane translocation. (5) p38 caused Bcl-2 degradation, and mediated (6) p53 activation and its translocation to (7) the nucleus (8) and mitochondria. These molecular events were inhibited by PEG-catalase, Fas/FasL antagonist (Kp-7-6) and p38 inhibitor (SB328020) in response to heat shock. (9) p53 bound to anti-apoptotic mitochondrial proteins Bcl-2 and Bcl-xL. Nuclear relocalisation of phospho-p53 led to decreased expression of (10) Bcl-2 and Bcl-xL, and increased expression of (11) Puma, (12) Noxa, (13) Bax and (14) FasL, and these changes were reduced by p53 inhibition (PFT- α). Inhibitors of p38 and p53 did not affect downstream mitochondrial apoptotic events such as loss of membrane potential and cytochrome c release. However, (15) caspase-3 activation and (16) chromatin condensation, which can occur through mitochondria as well as alternate pathways, were partially reduced by inhibitors of p38 and p53.

Figure 1: Heat shock induces ROS generation

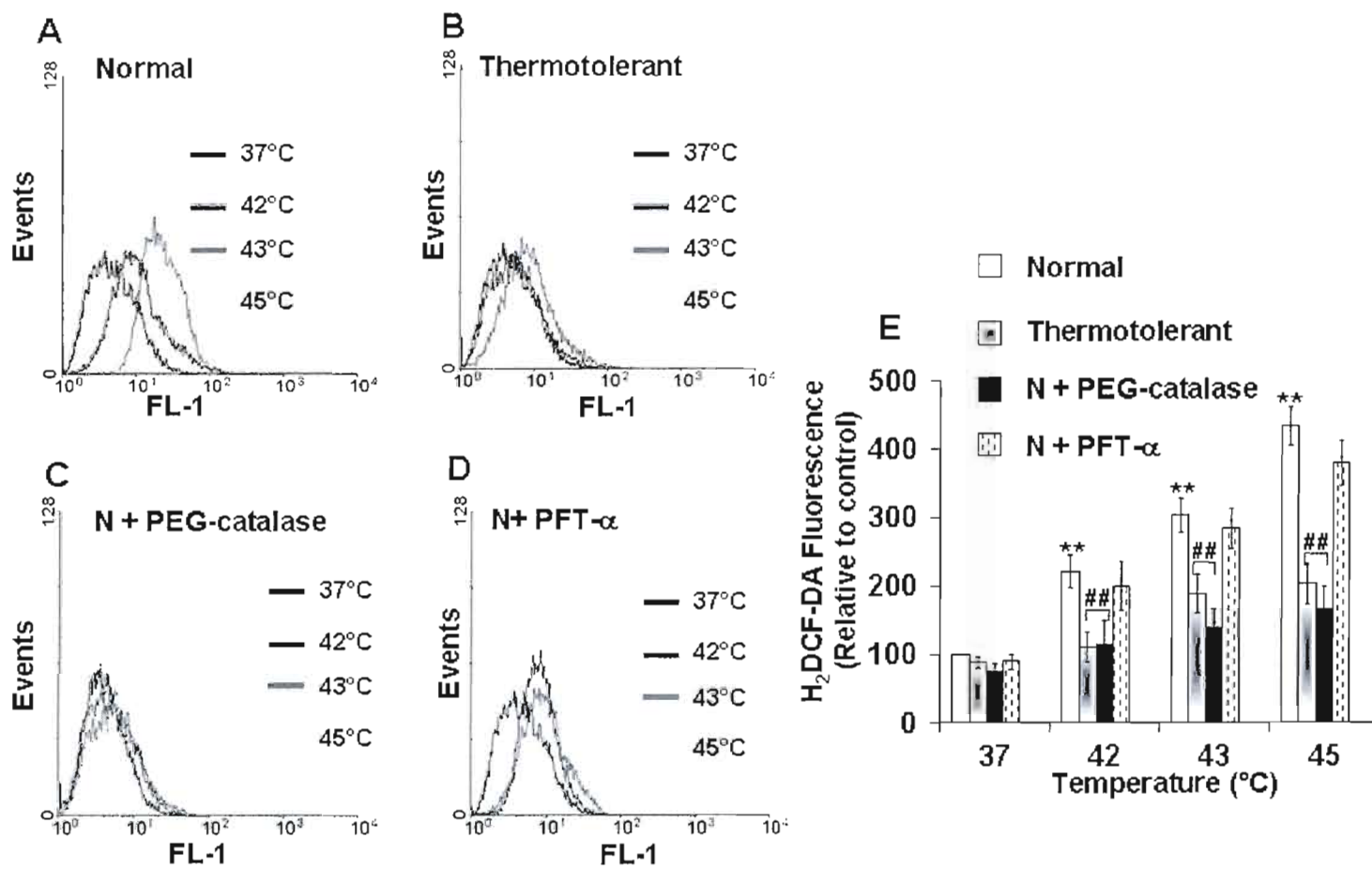


Figure 1A-E

Figure 2: Heat shock induces Daxx translocation to plasma membrane

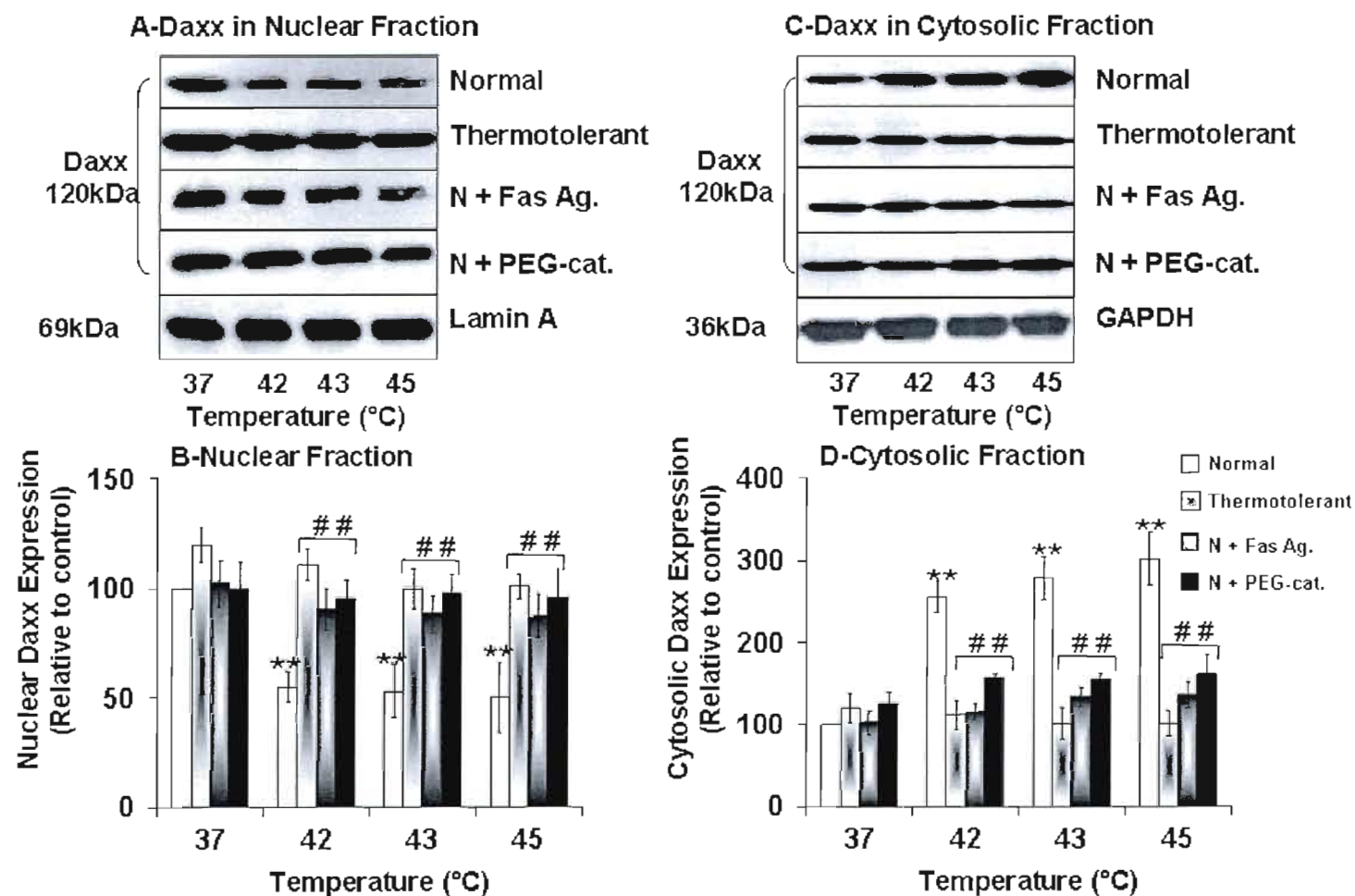


Figure 2A-D

Figure 2: Heat shock induces Daxx and ASK-1 translocation to plasma membrane

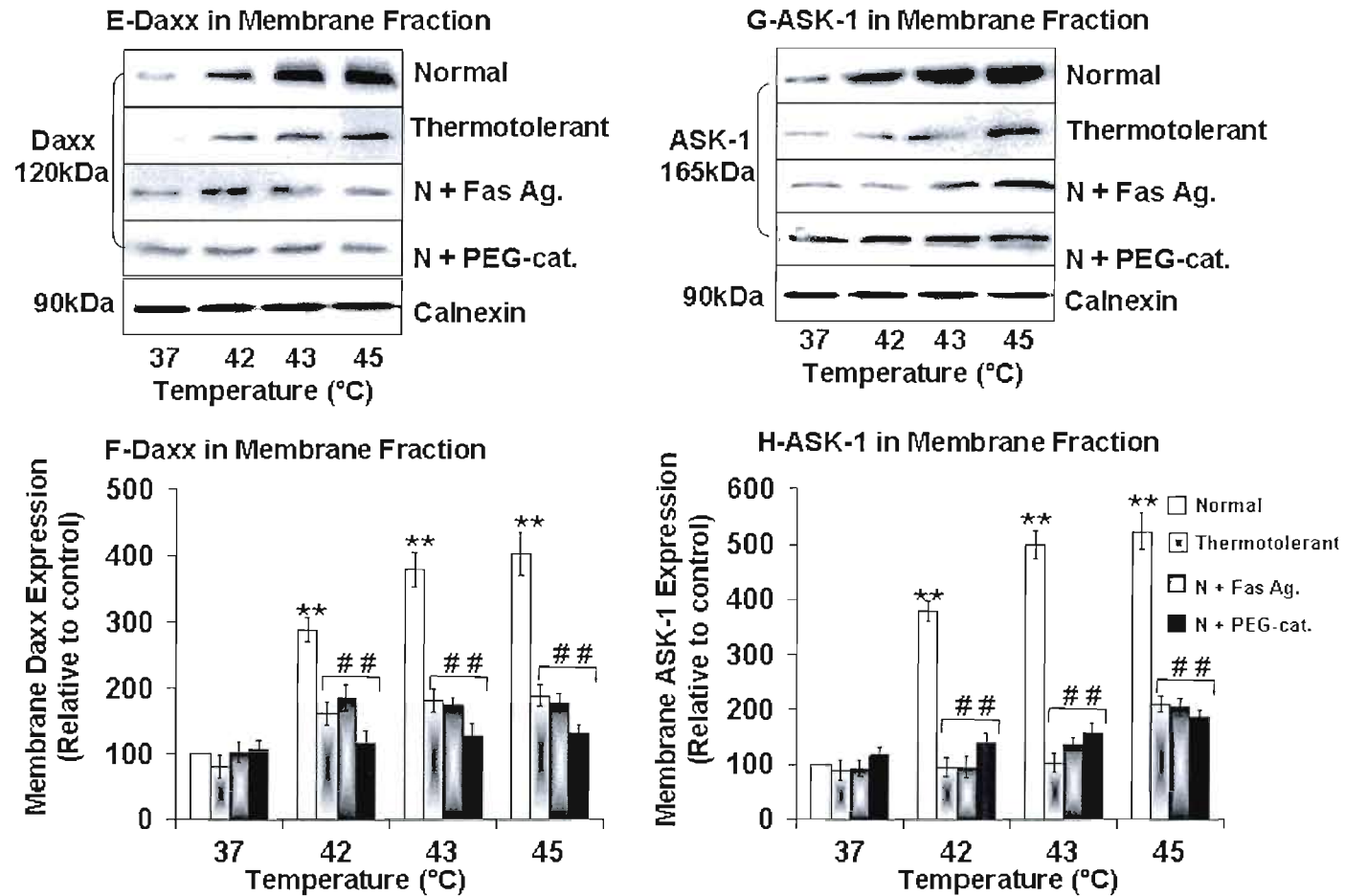


Figure 2E-H

Figure 2: Heat shock induces binding of Daxx and ASK-1 to FasR

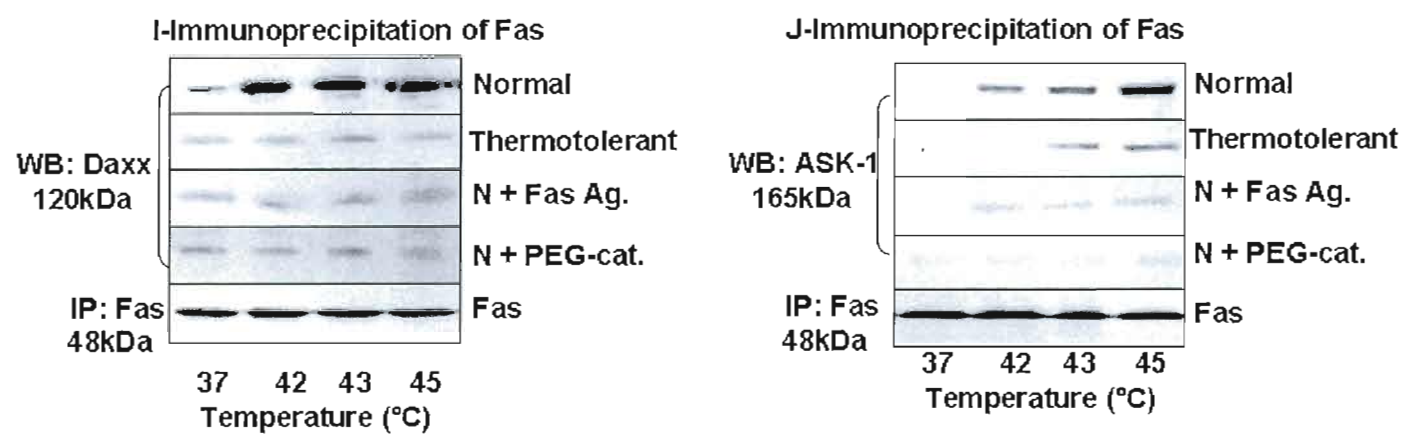


Figure 2I-J

Figure 2: Purity of fractions

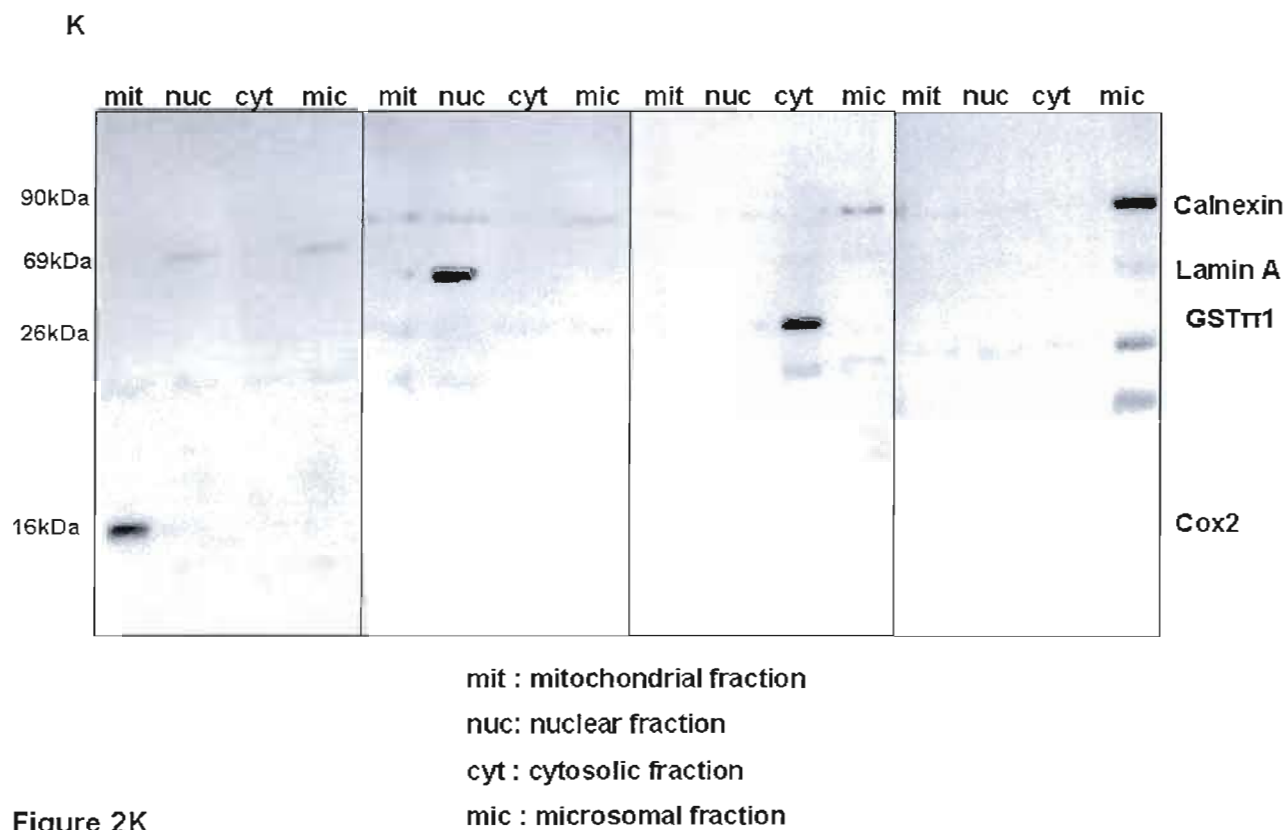


Figure 2K

Figure 3: Heat shock induces JNK phosphorylation

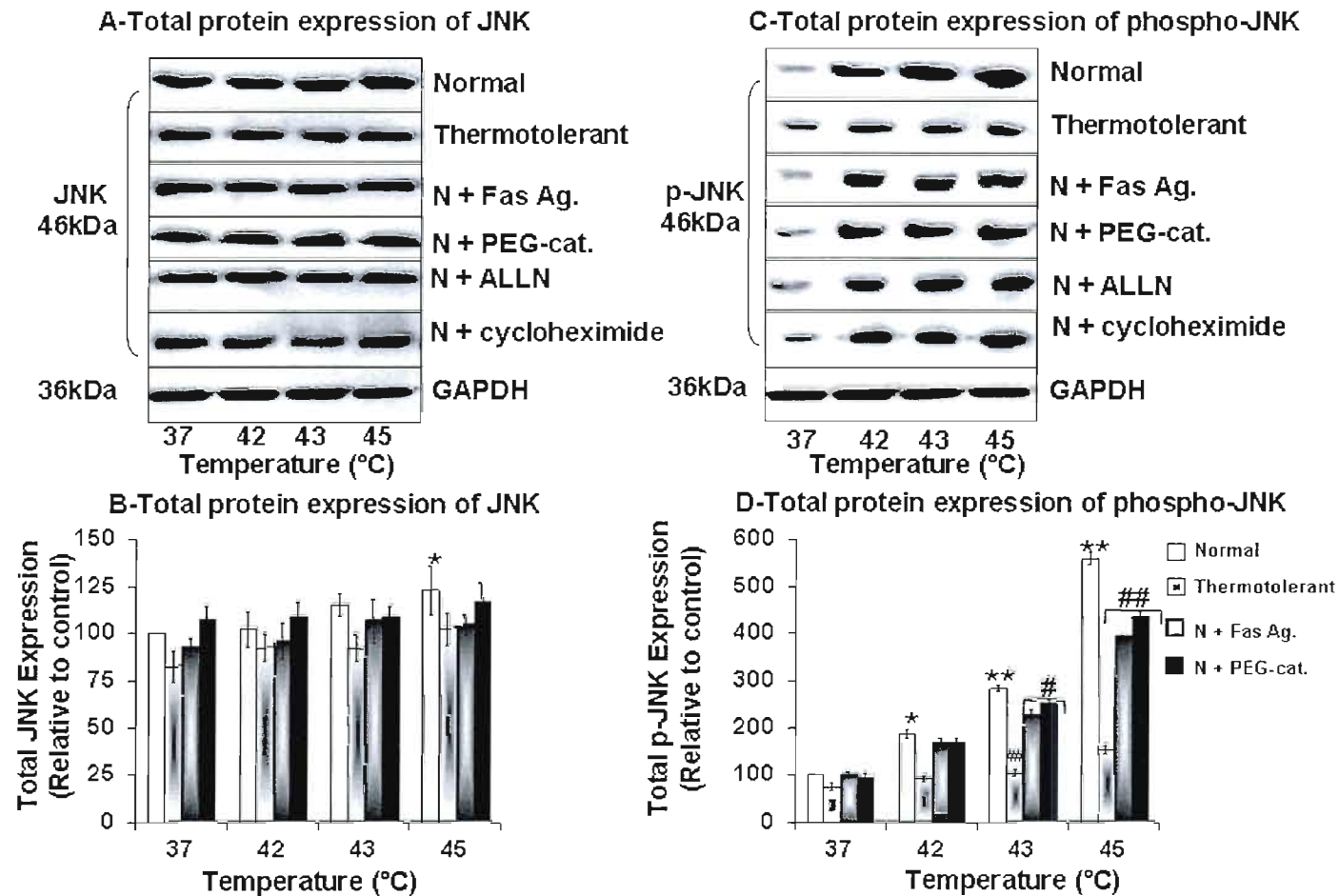


Figure 3A-D

Figure 3: Heat shock induces c-Jun phosphorylation

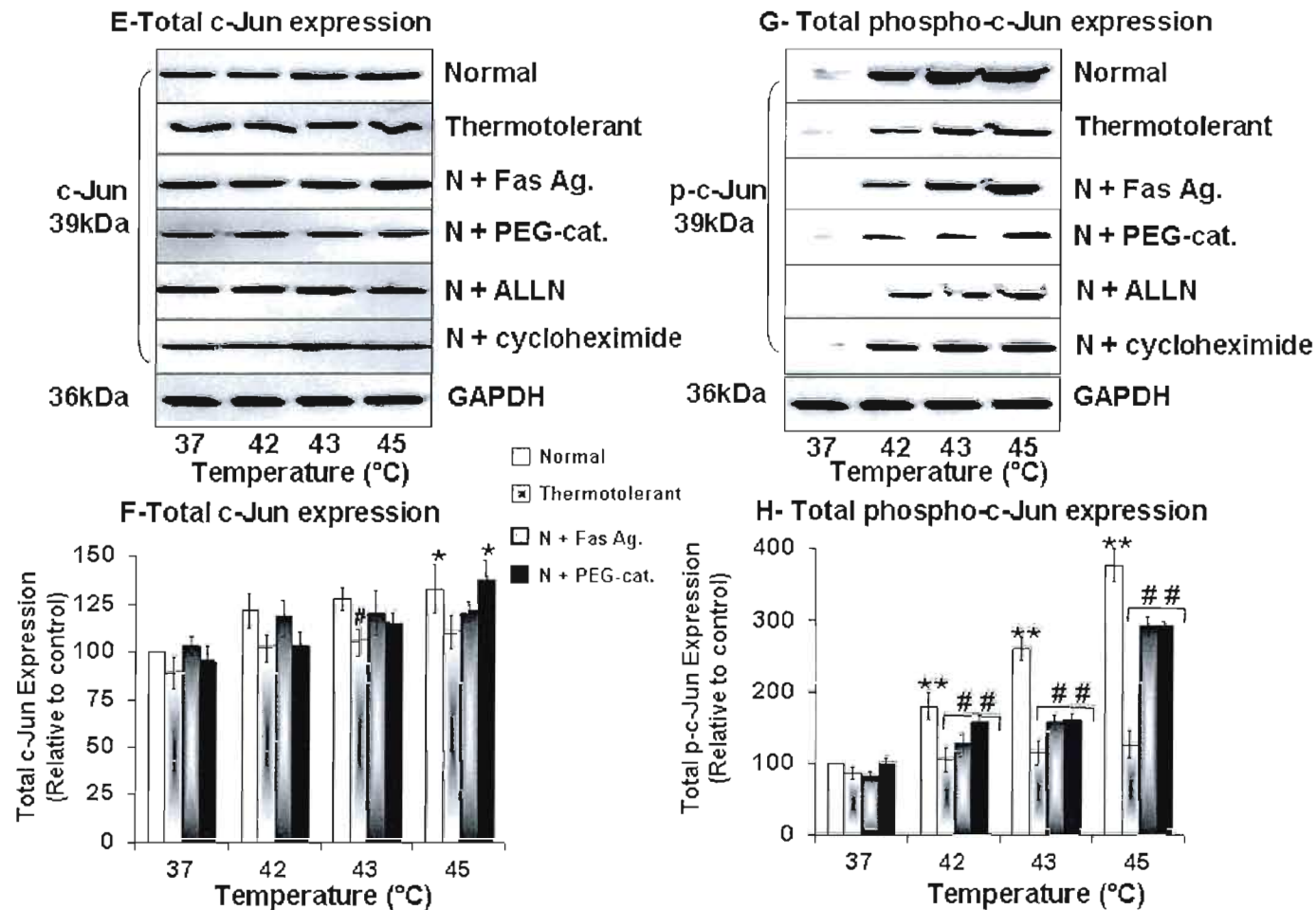


Figure 3E-H

Figure 3: Heat shock induces c-Jun phosphorylation

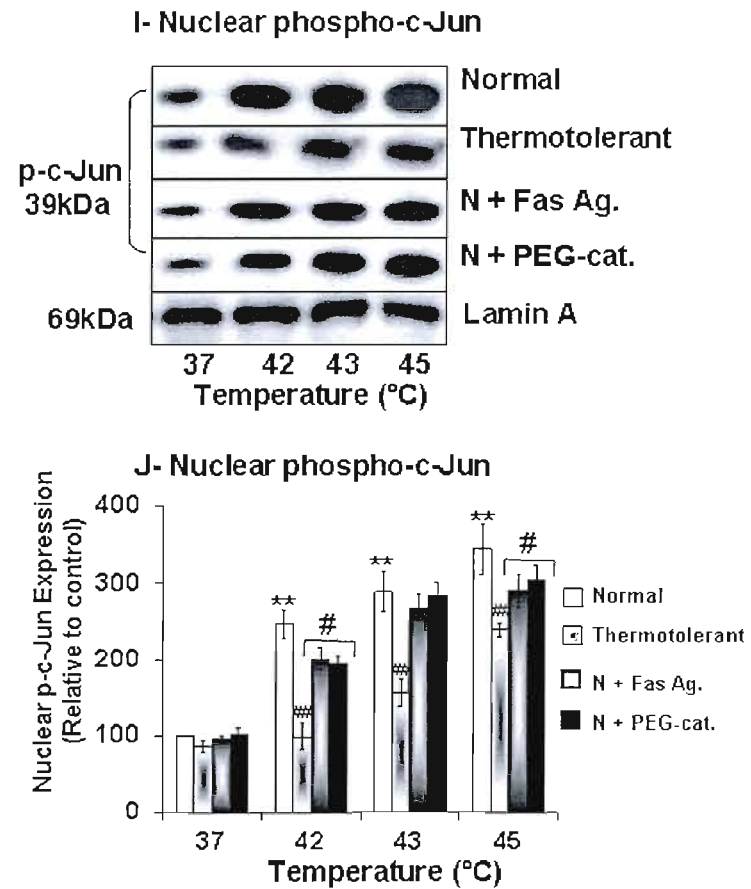


Figure 3I-J

Figure 4: Heat shock induces Bax translocation to mitochondria

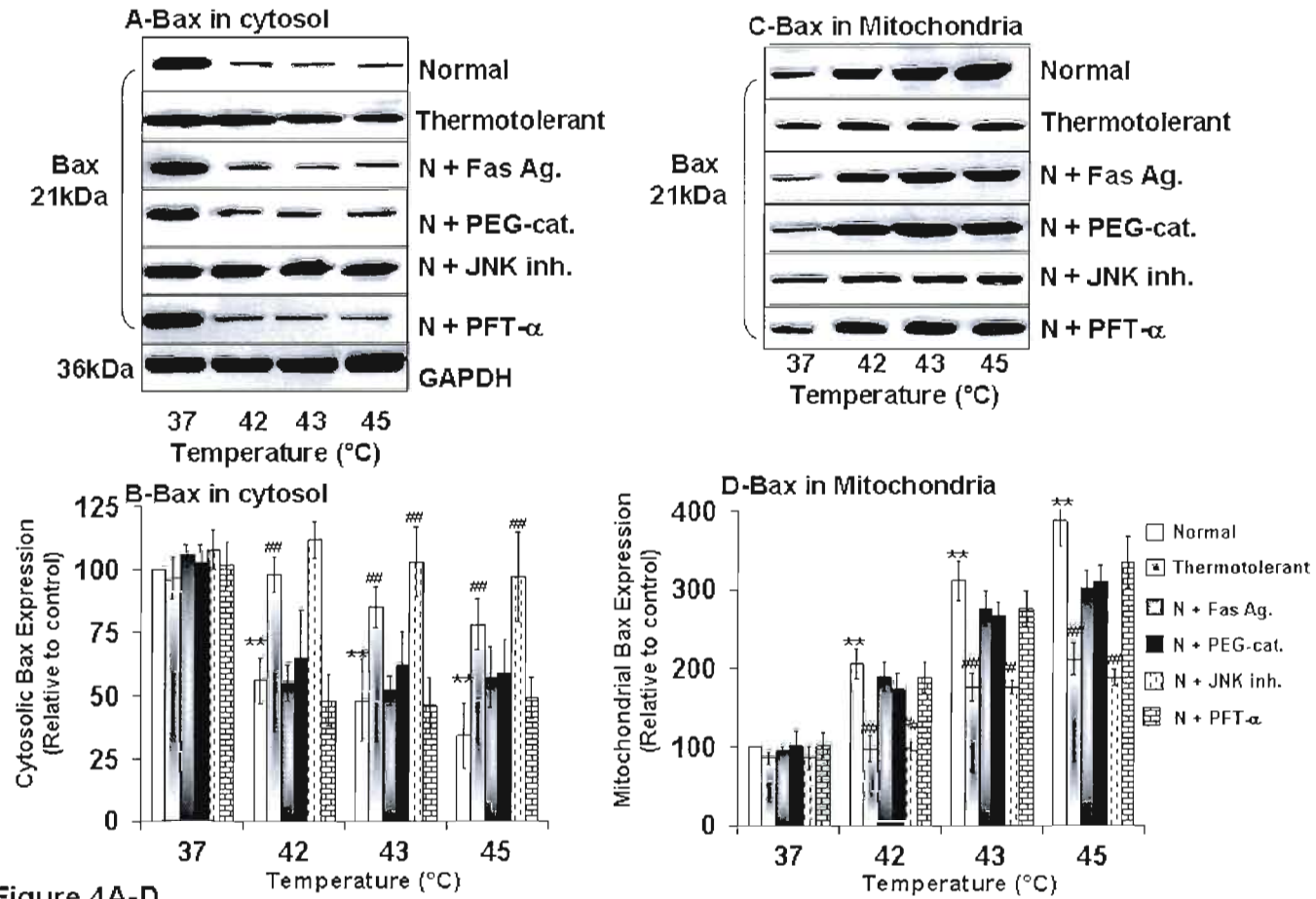


Figure 5A: Heat shock induces loss of MMP

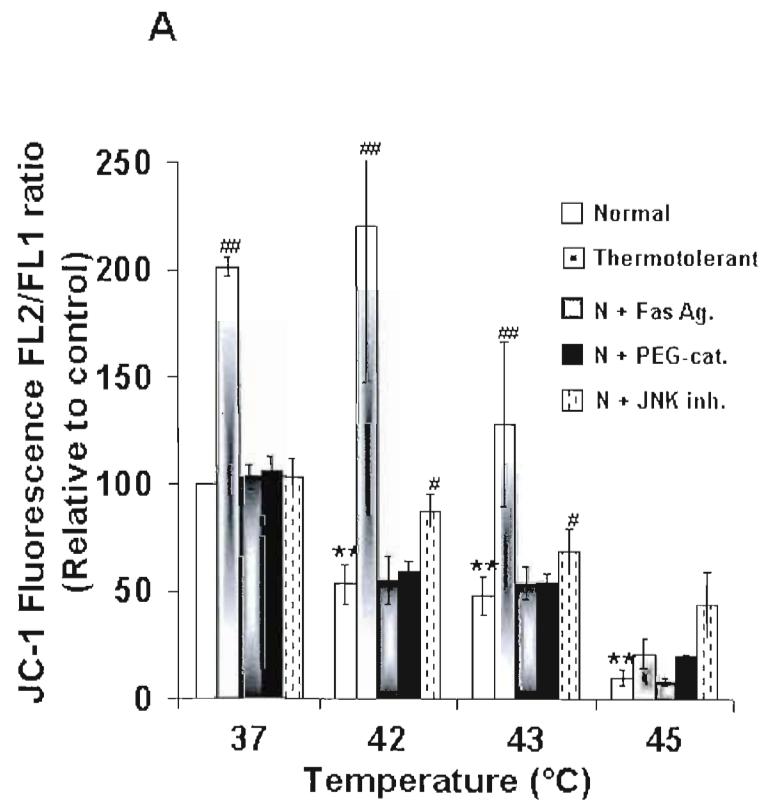


Figure 5A

Figure 5: Heat shock induces cytochrome c release to the cytosol

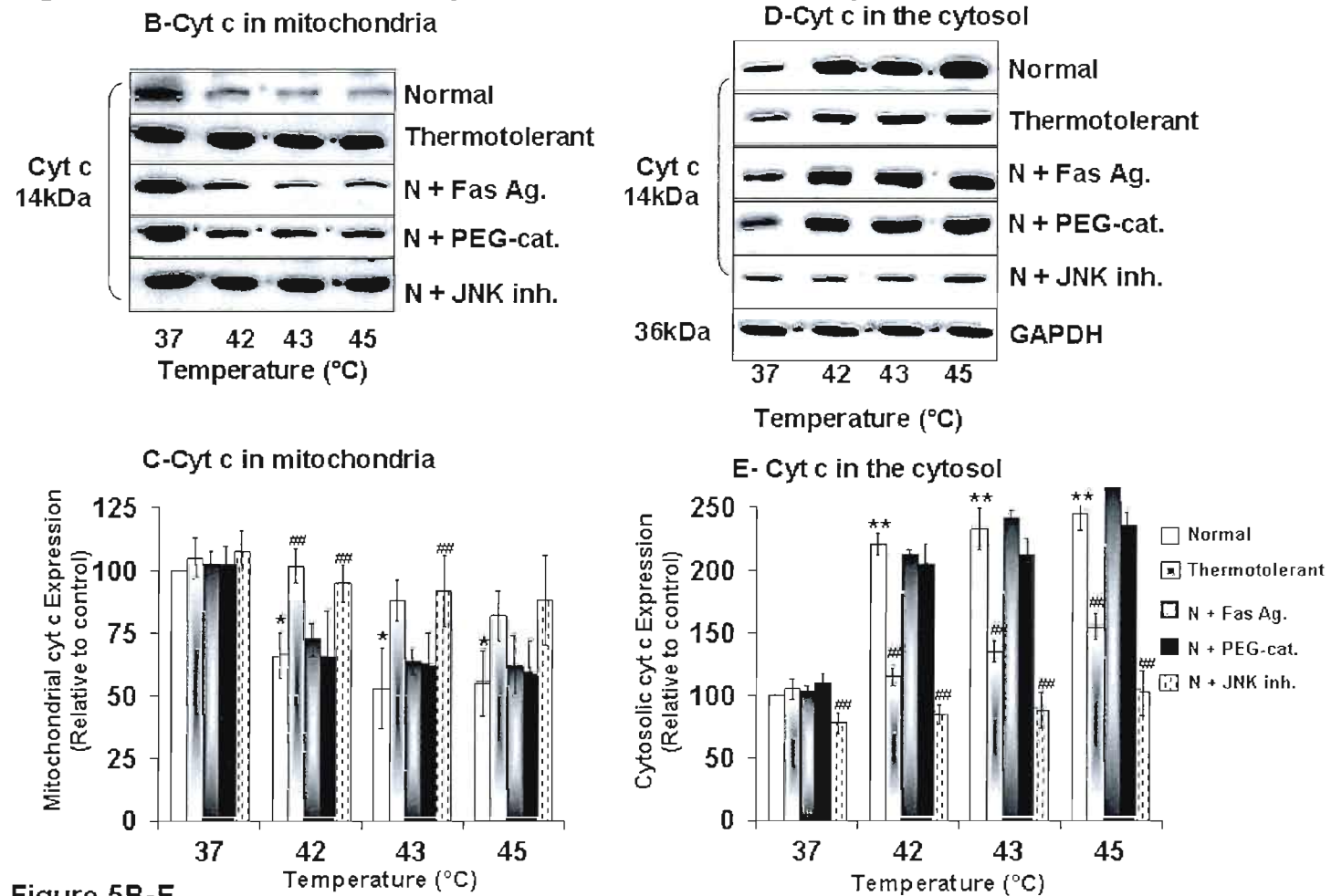


Figure 5B-E

Figure 6: Heat shock induces caspase 3 activation

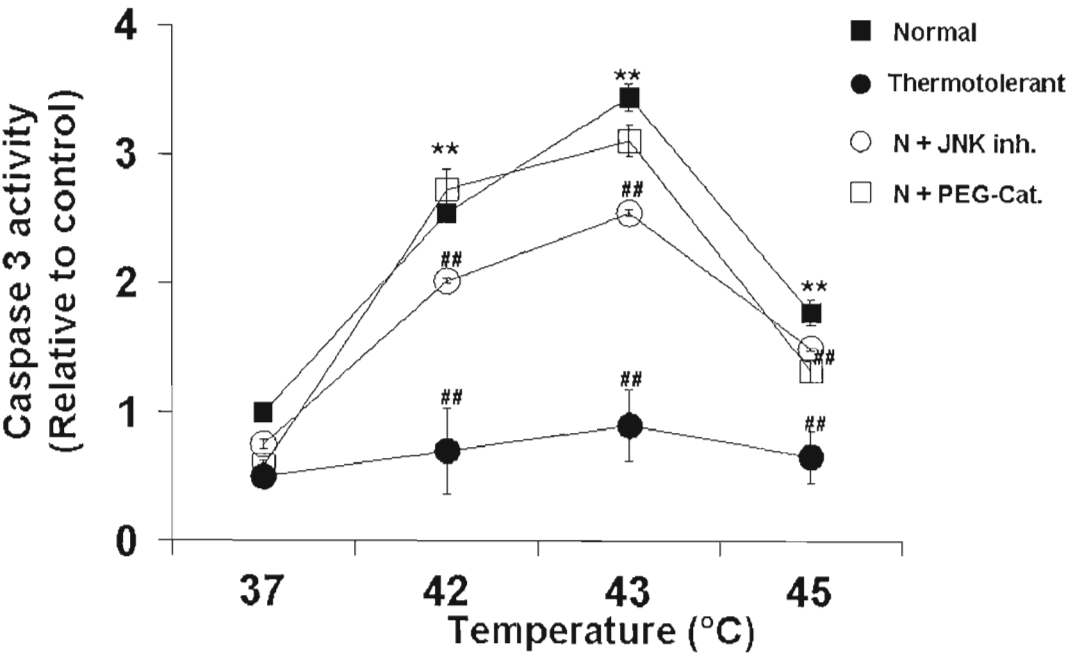


Figure 6

Figure 7: Heat shock induces chromatin condensation

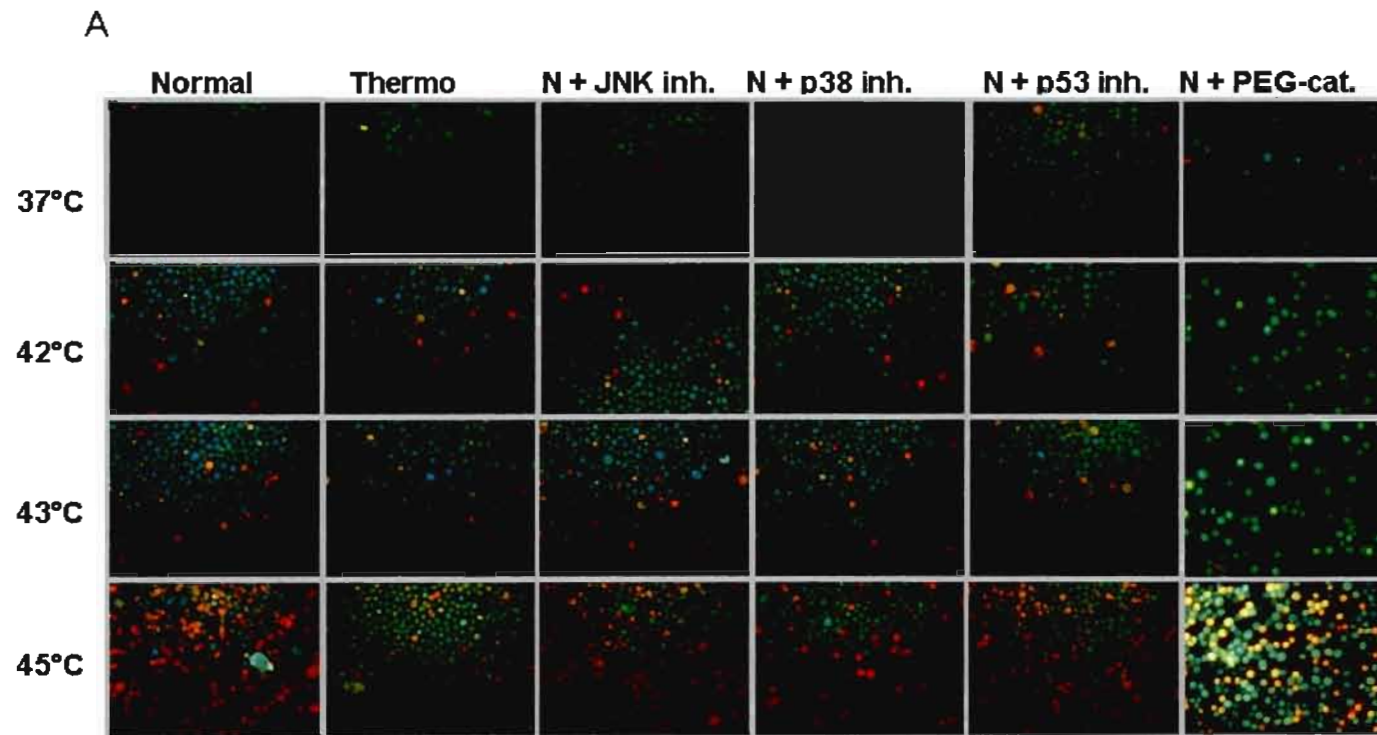


Figure 7A

Figure 7: Heat shock induces chromatin condensation

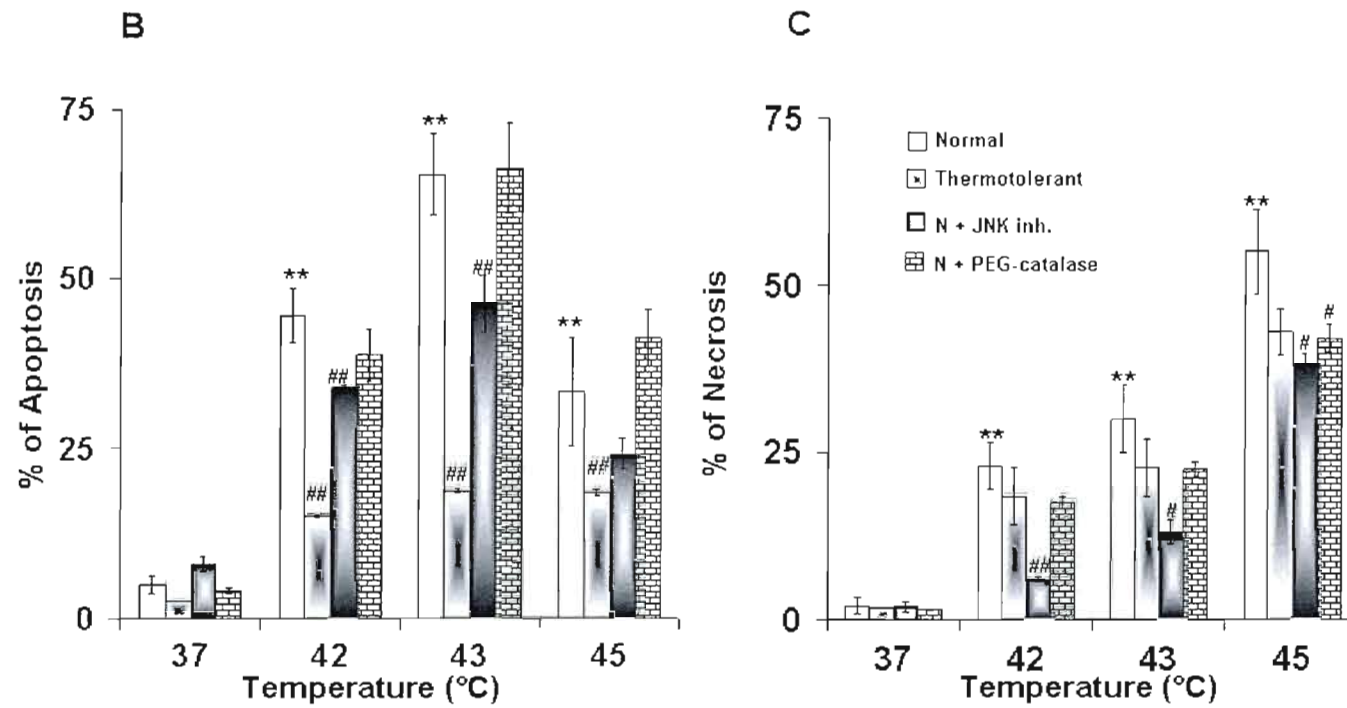


Figure 7B-C

Figure 8: Heat shock induces p38 phosphorylation

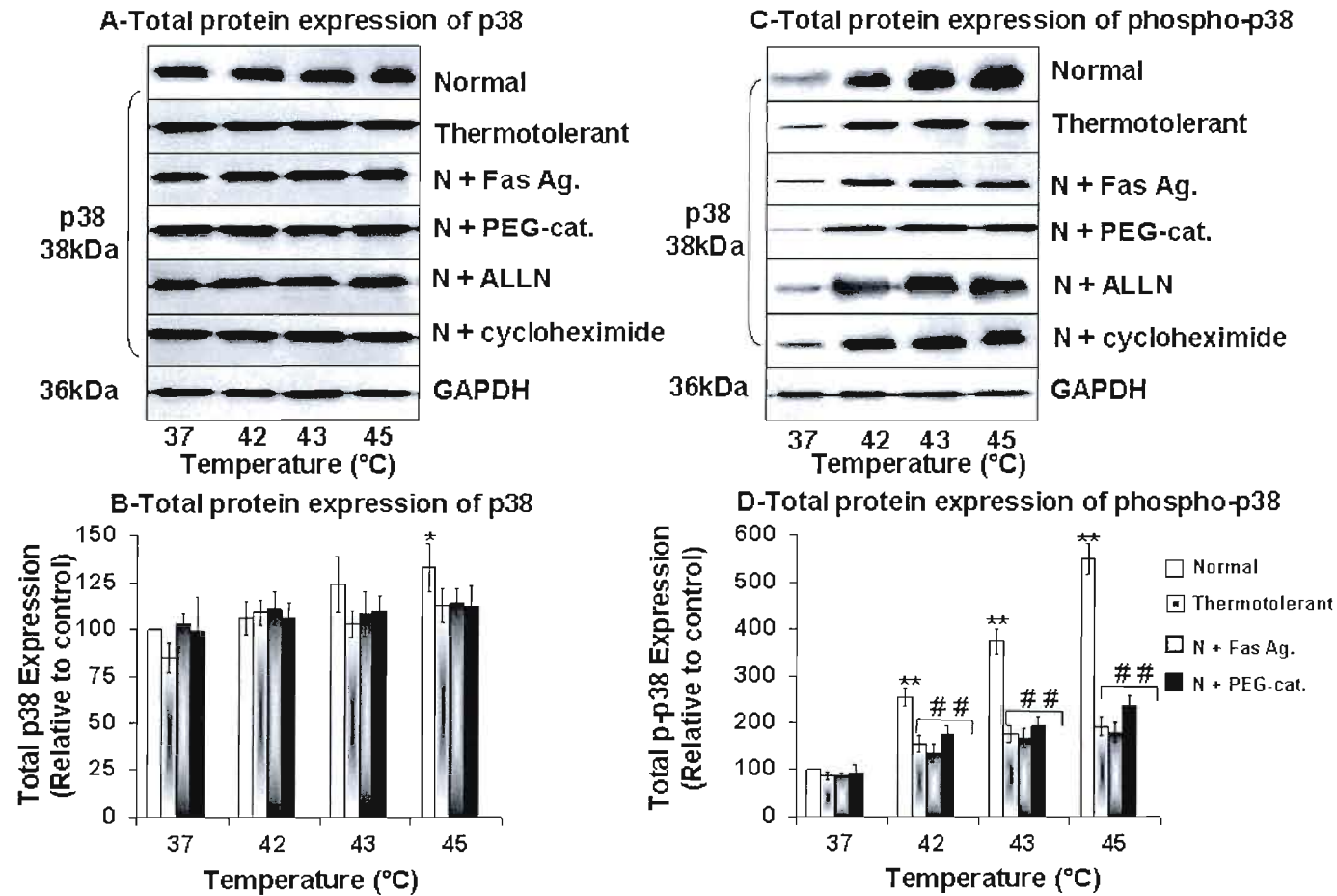


Figure 8A-D

Figure 9: Heat shock induces HSP27 phosphorylation

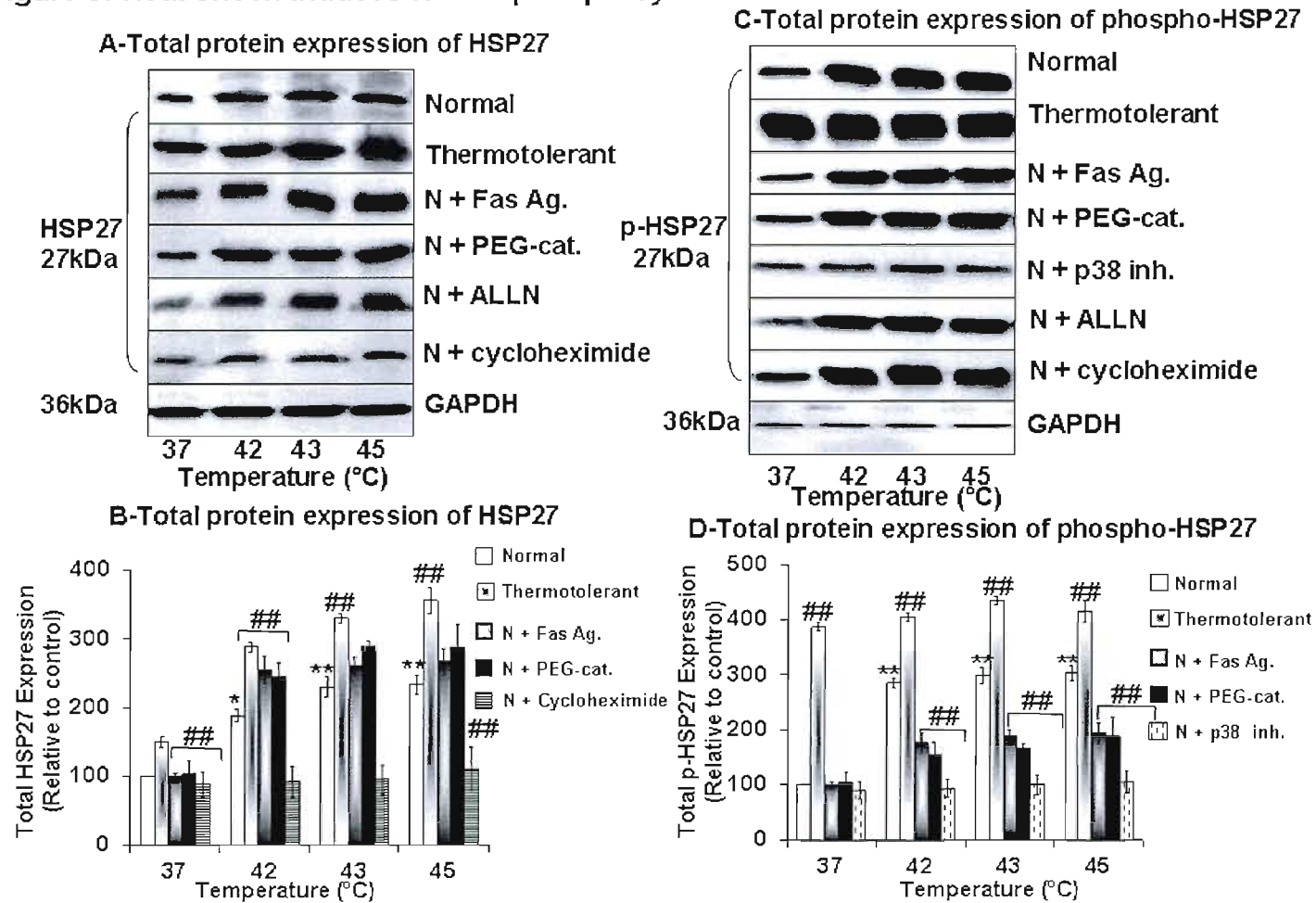


Figure 9A-D

Figure 9: Heat shock induces HSP27 phosphorylation

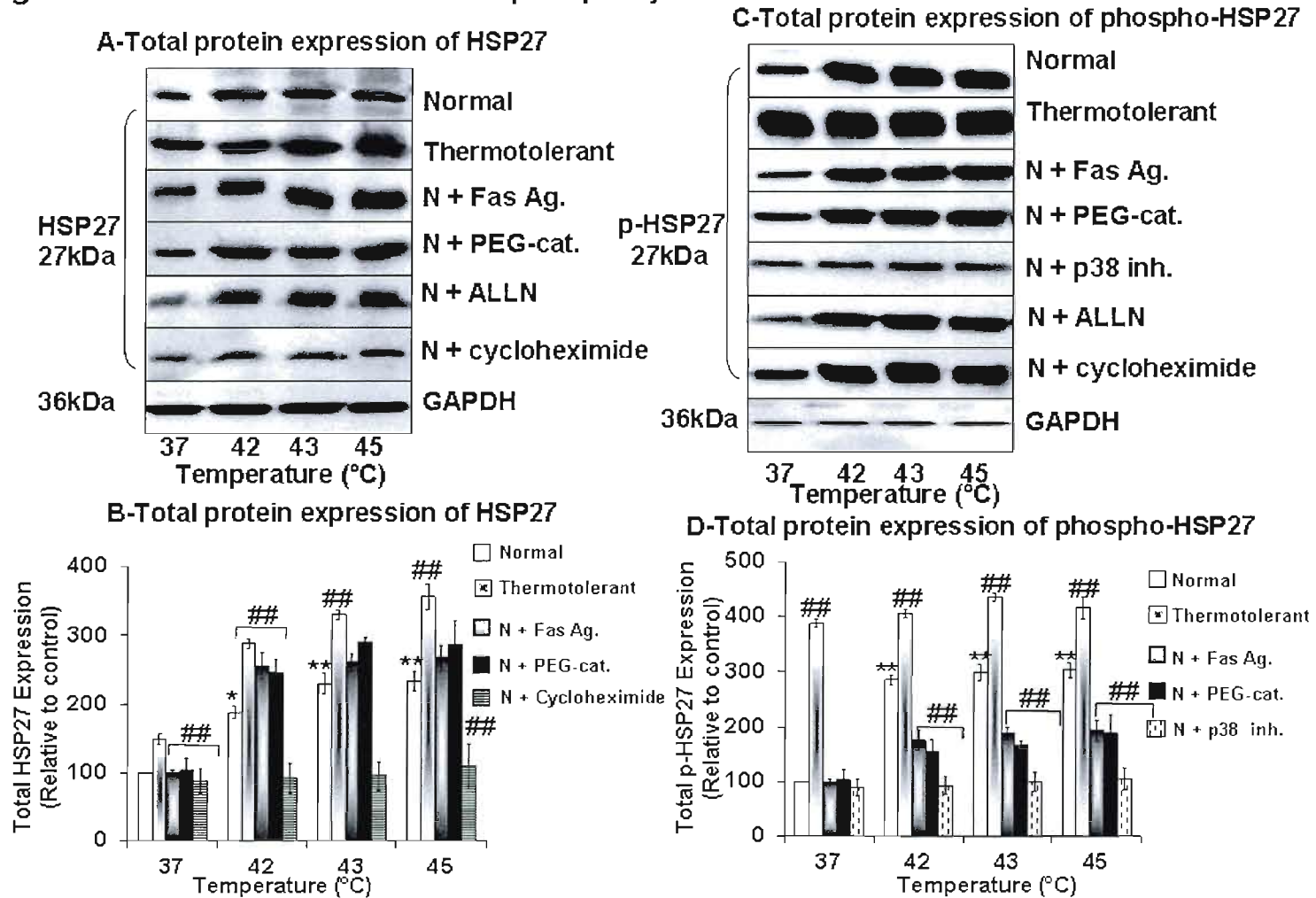


Figure 9A-D

Figure 9: Heat shock induces HSP27 relocalisation to the nuclear fraction

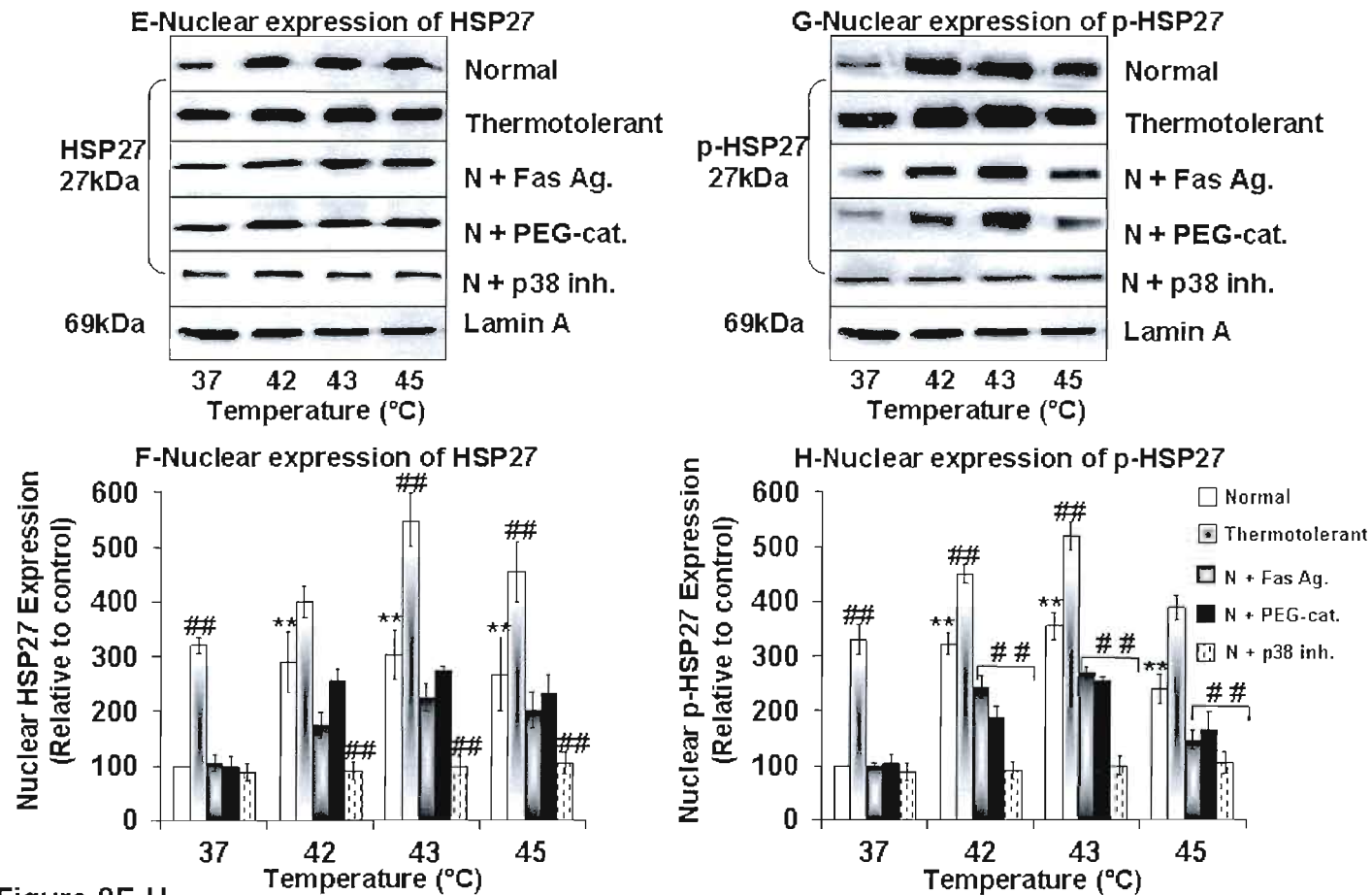


Figure 9: Heat shock induces HSP27 relocalization to the microsomal fraction

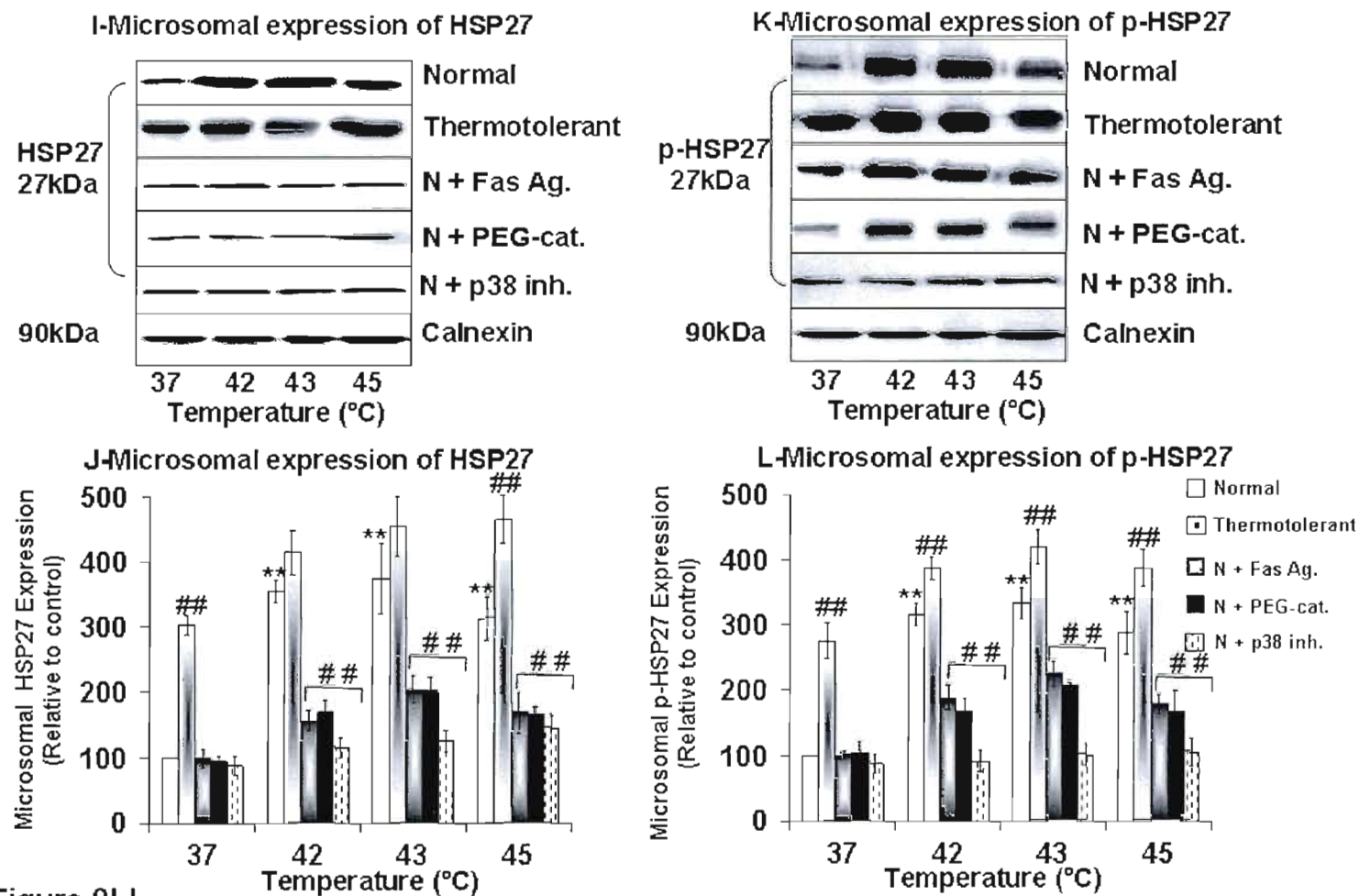
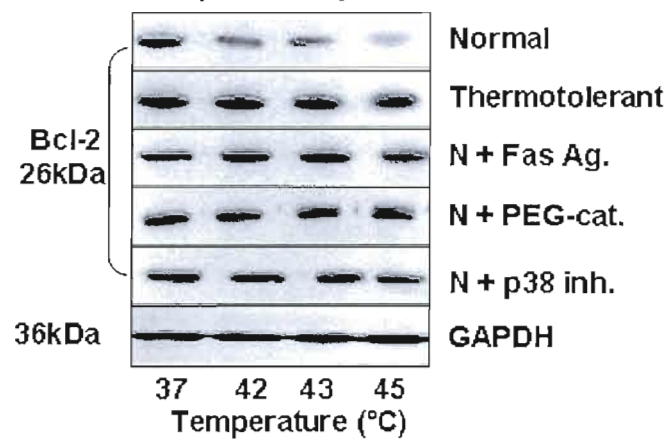


Figure 9I-L

Figure 10: Heat shock induces p38-mediated Bcl-2 degradation

A-Total protein expression of Bcl-2



B-Total protein expression of Bcl-2

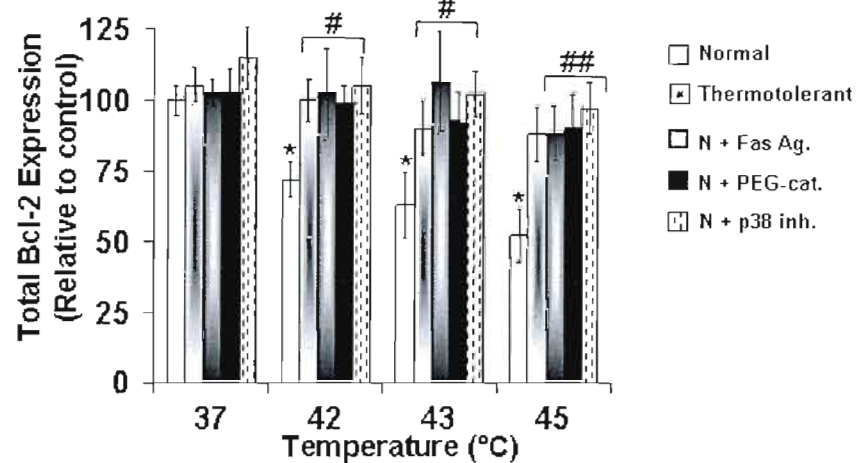


Figure 10A-B

Figure 11: Heat shock induces p53 phosphorylation at serine 15

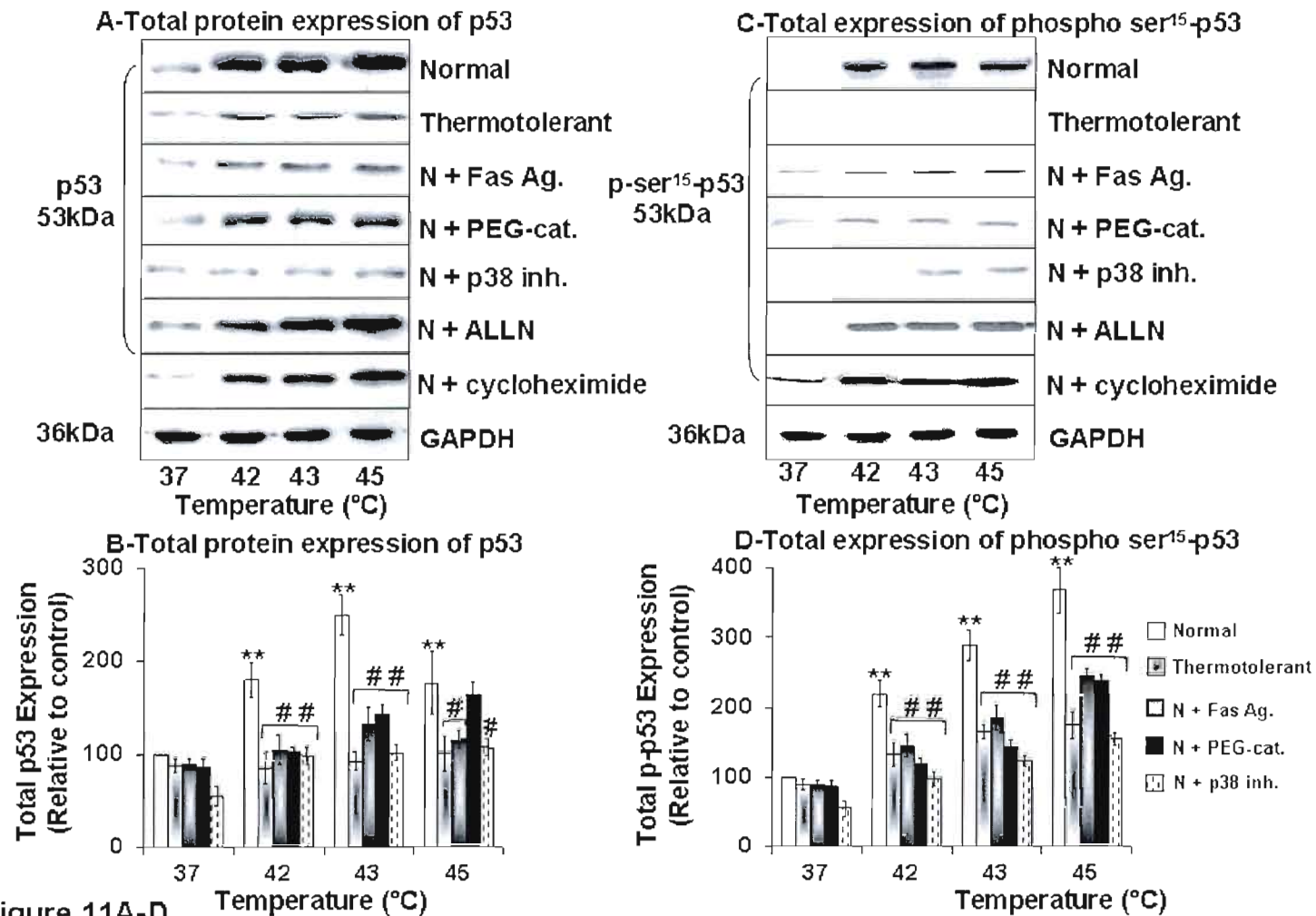


Figure 11: Heat shock induces p53 phosphorylation at serine 46

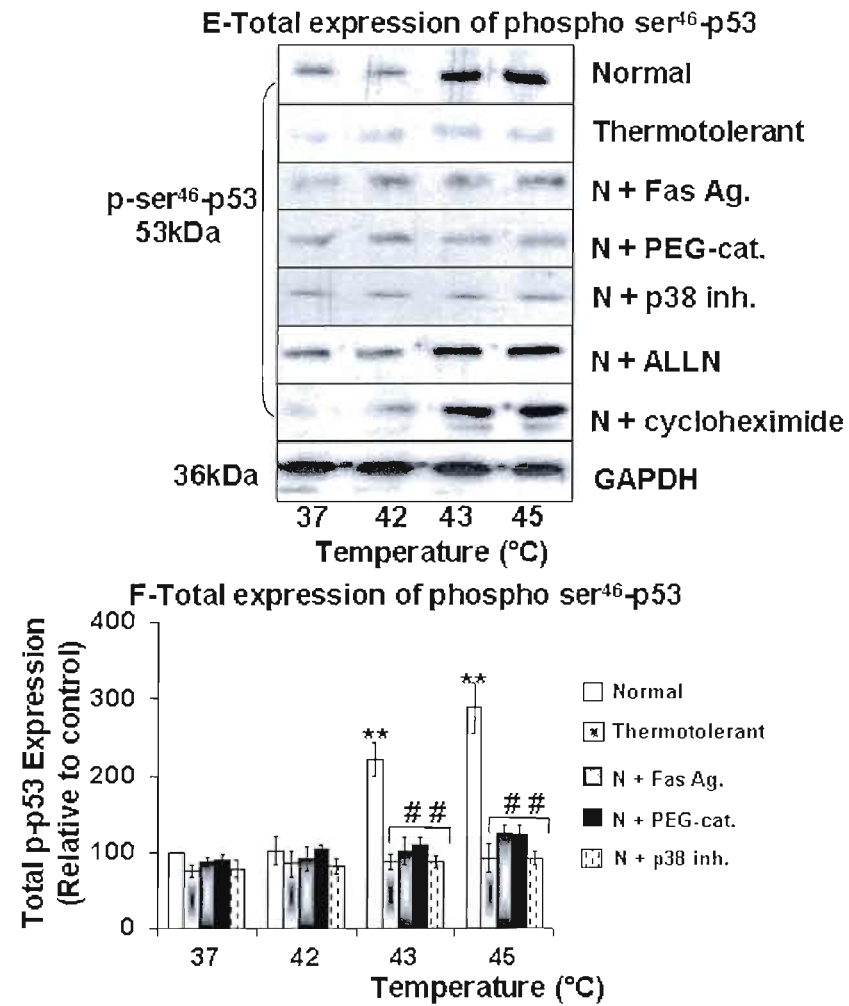


Figure 11E-F

Figure 11: Heat shock induces p53 relocalization

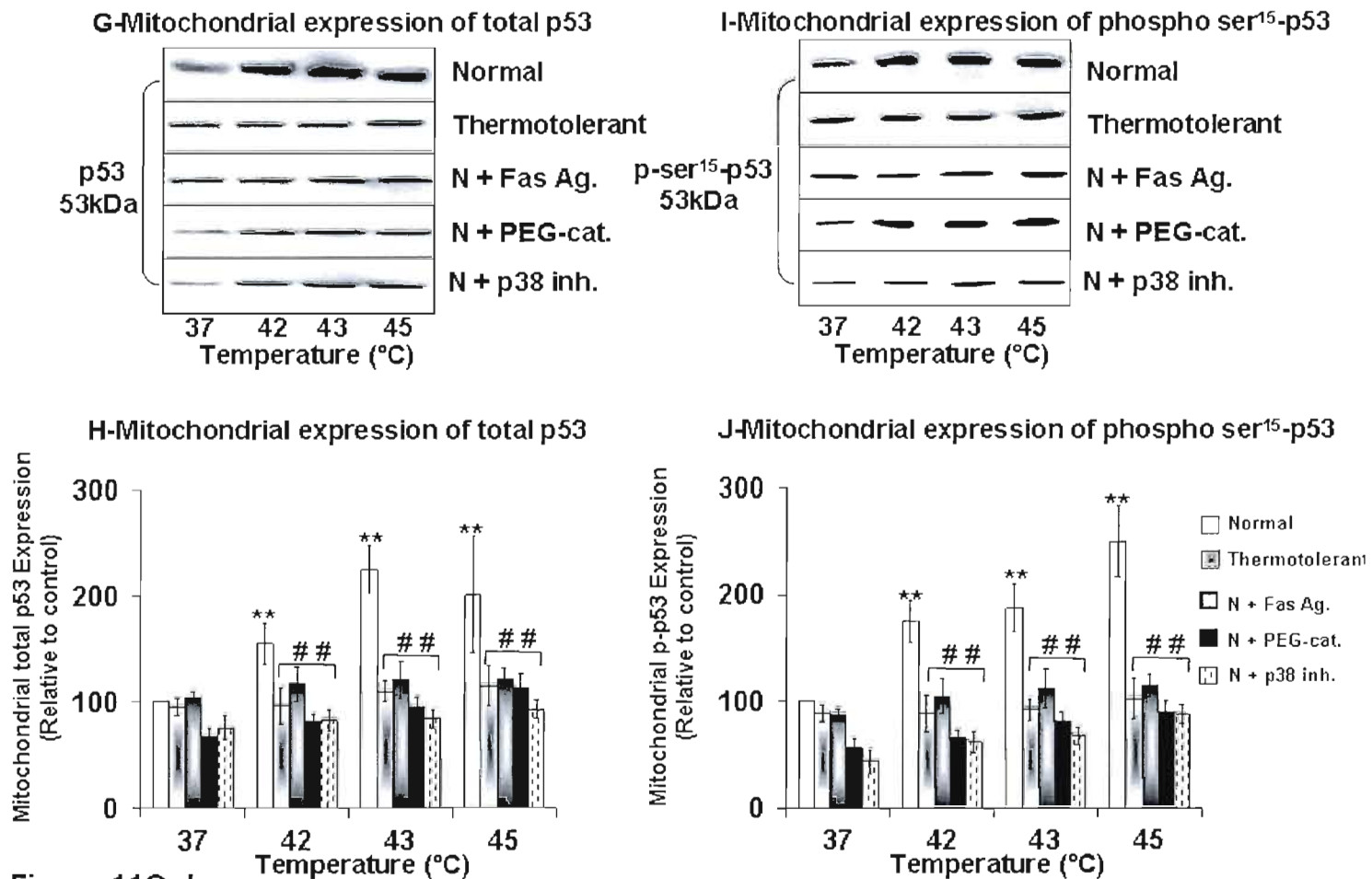


Figure 11G-J

Figure 11: Heat shock induces p53 nuclear relocalization

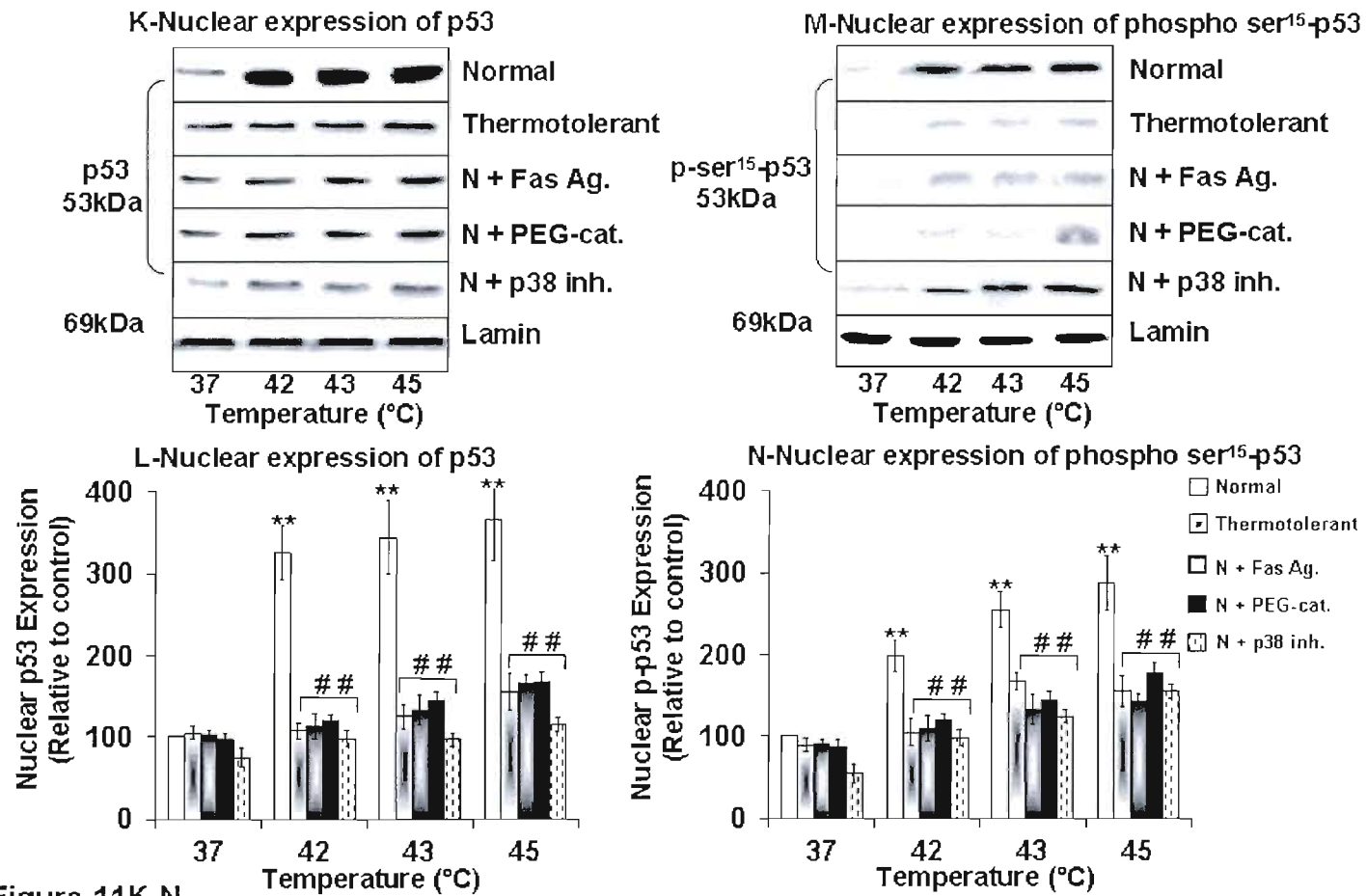


Figure 12: p53 interacts with Bcl-2 and Bcl-xL but not with Bax or Bak during heat shock-induced apoptosis

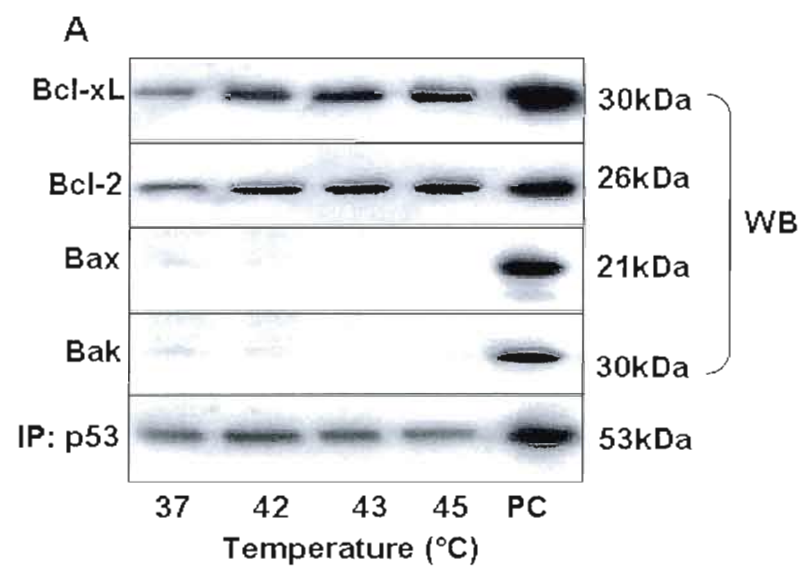


Figure 12A

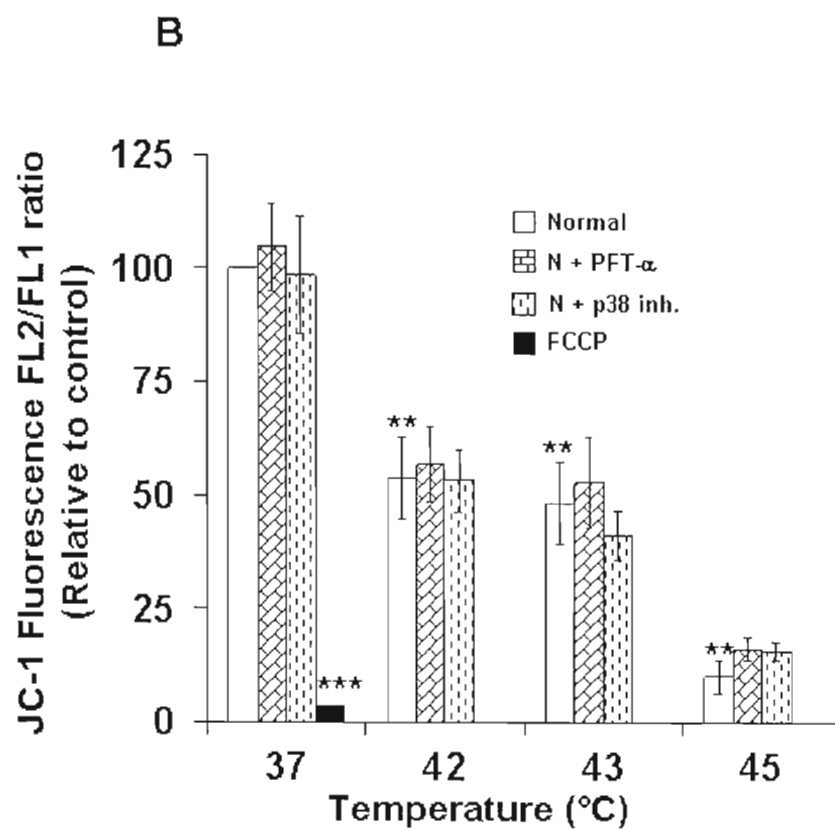
Figure 12: Heat shock induces loss of MMP**Figure 12B**

Figure 12: Heat shock induces cytochrome c release to the cytosol

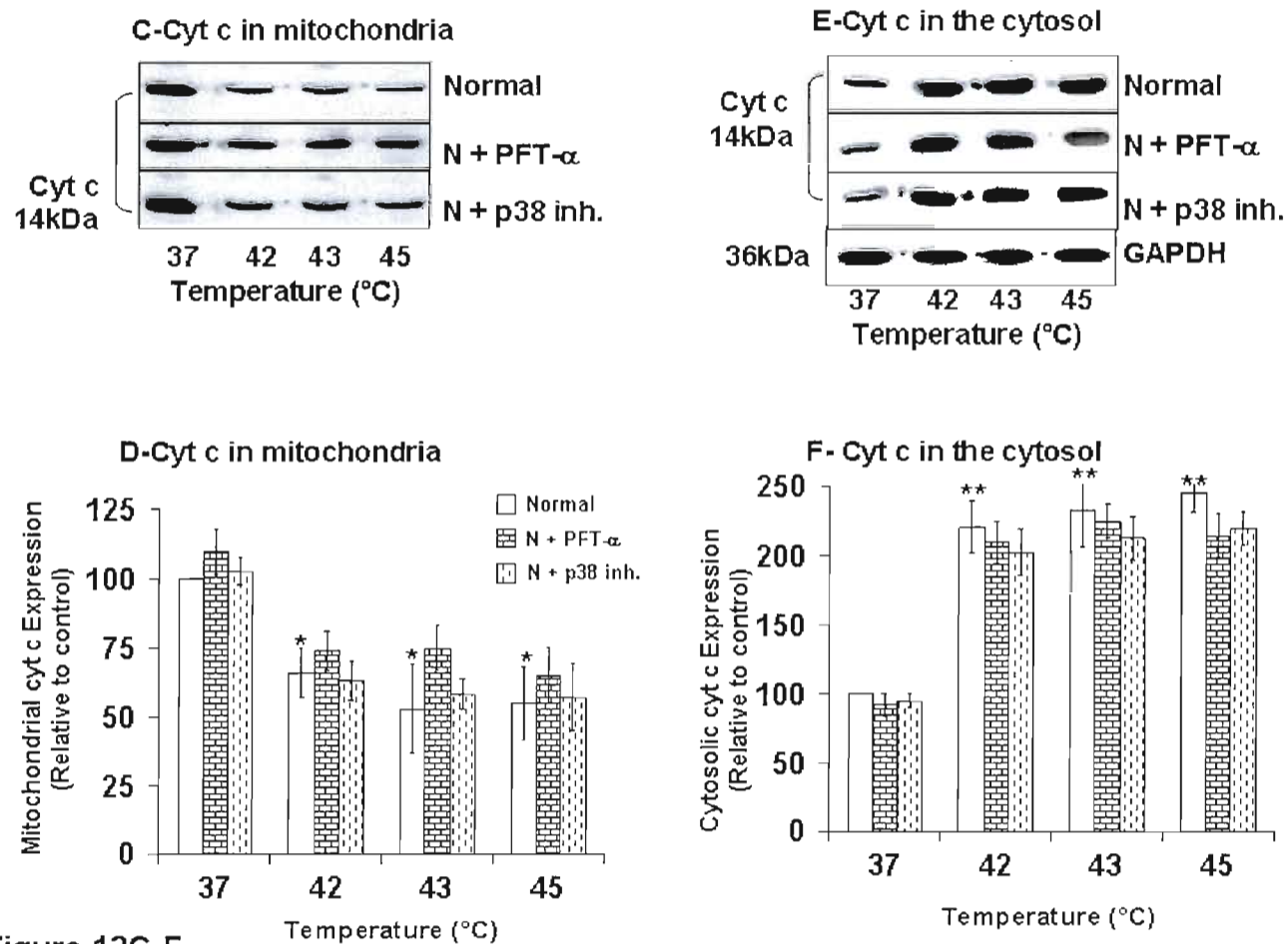


Figure 12C-F

Figure 12: Heat shock induces caspase 3 activation

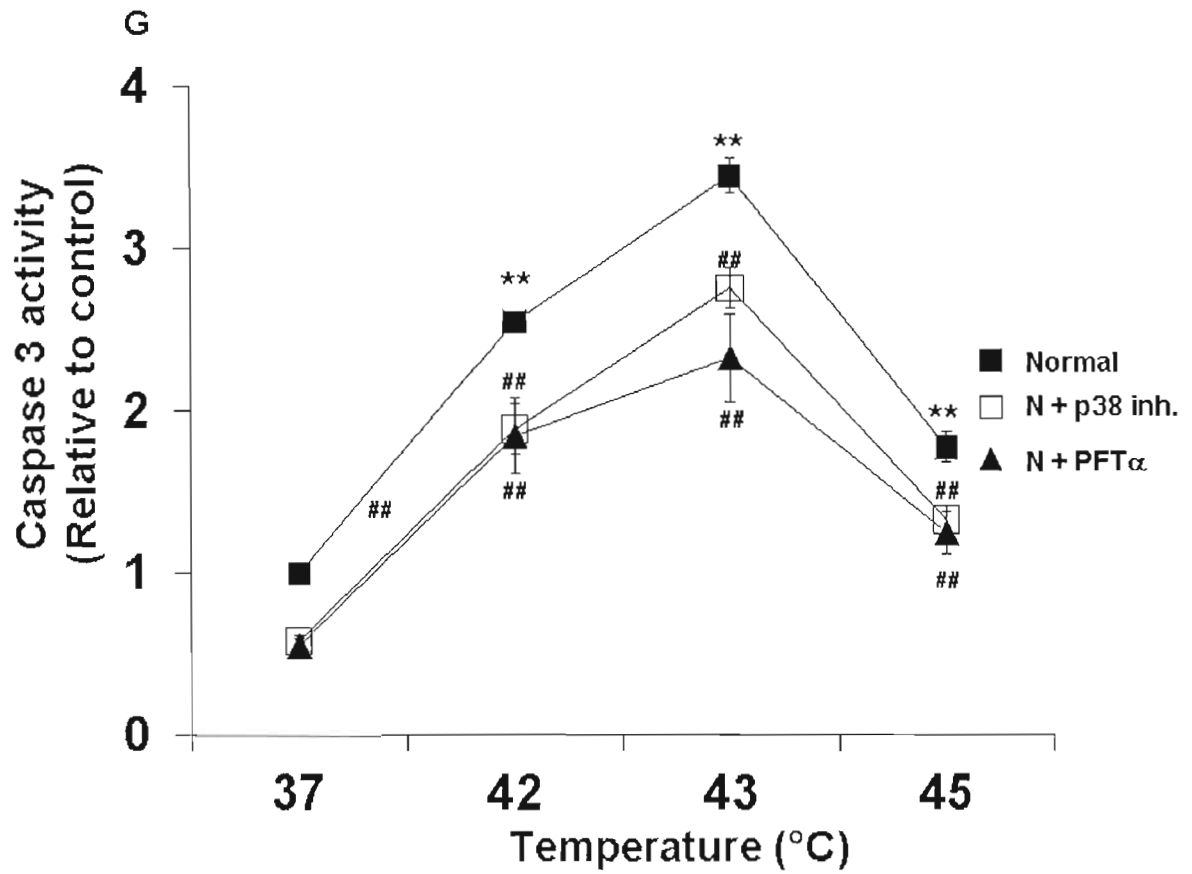


Figure 12G

Figure 12: Heat shock induces Chromatin condensation

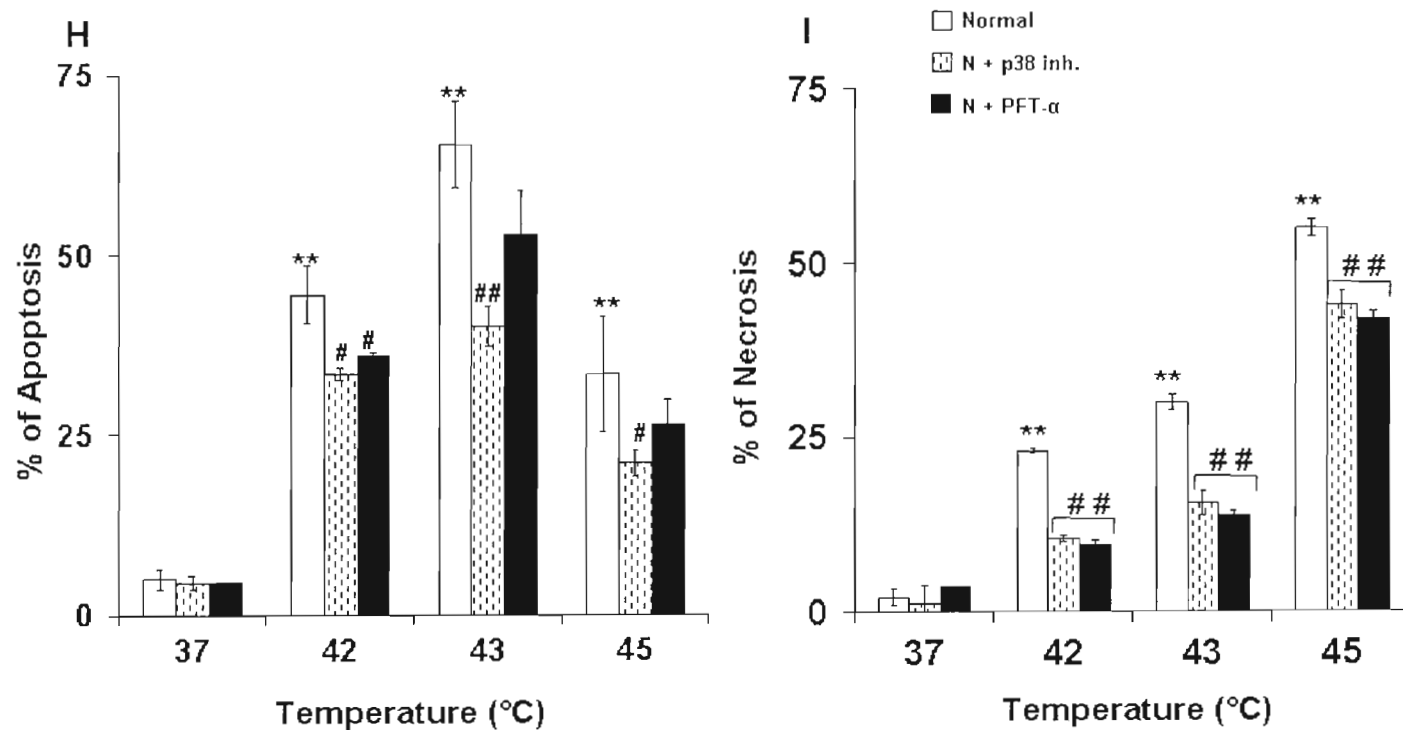


Figure 12H-I

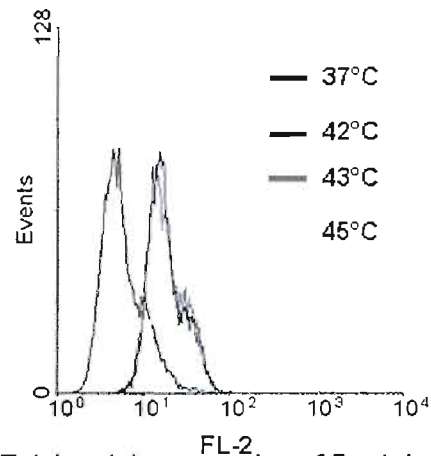
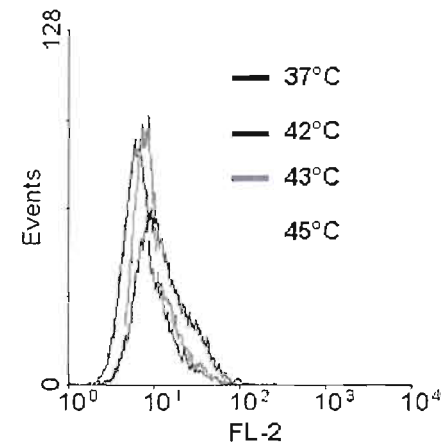
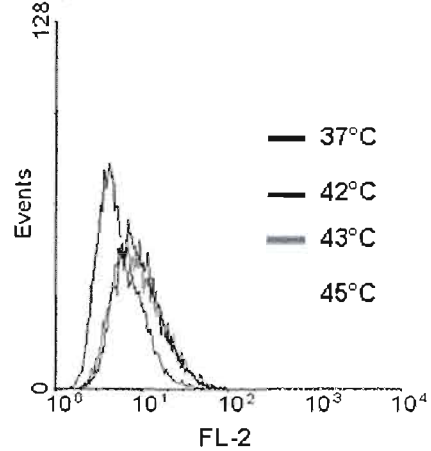
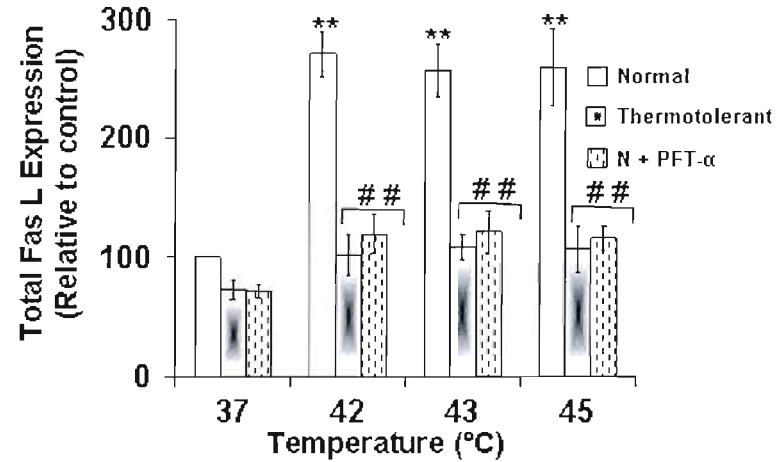
Figure 13: Heat shock induces transcriptional activity of p53**A-Total protein expression of Fas L in normal cells****B-Total protein expression of Fas L in thermotolerant cells****C-Total protein expression of Fas L in normal cells + PFT- α** **D-Total protein expression of Fas****Figure 13A-D**

Figure 13: Heat shock induces transcriptional activity of p53

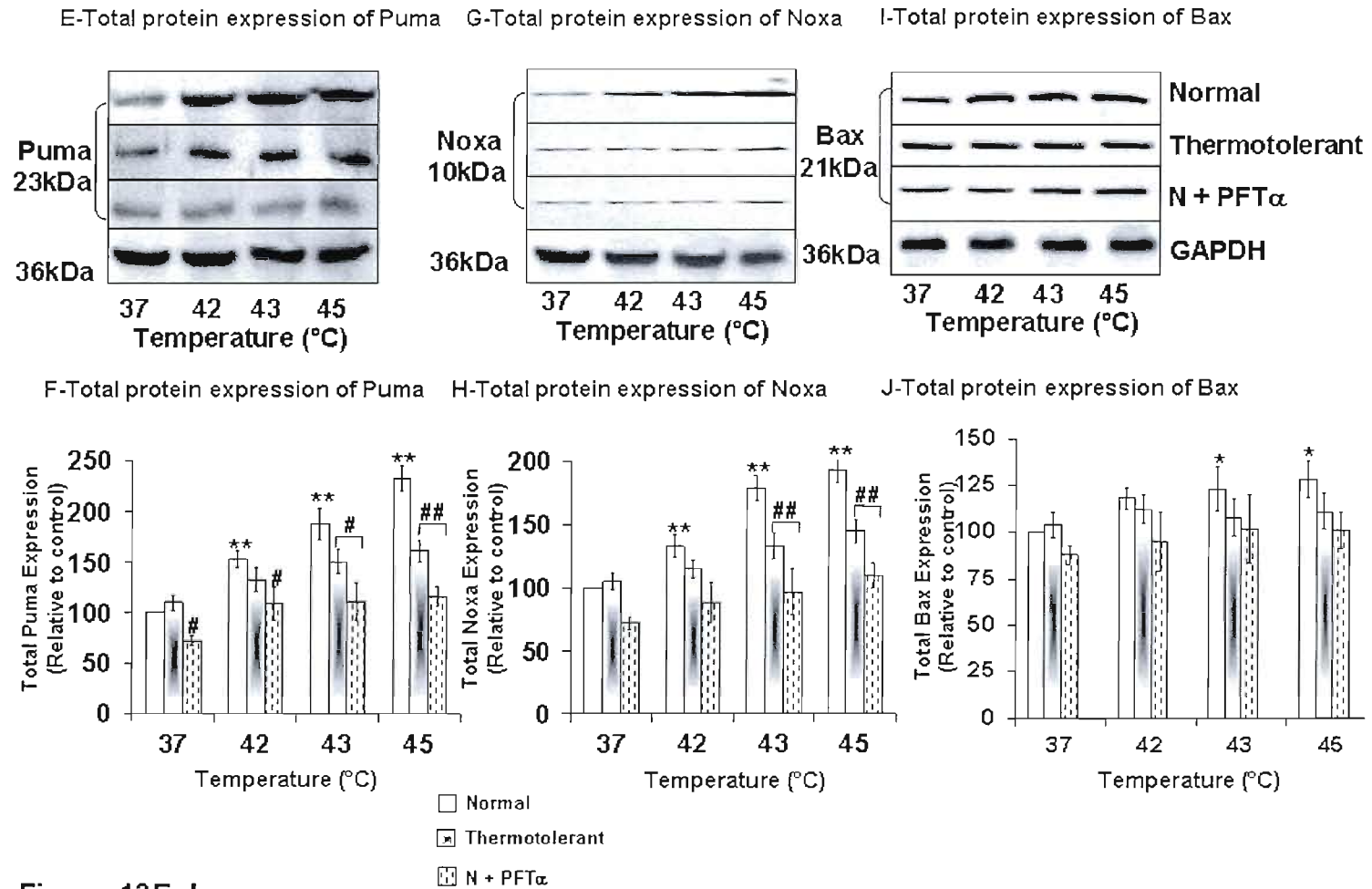


Figure 13E-J

Figure 13: Heat shock induces transcriptional activity of p53

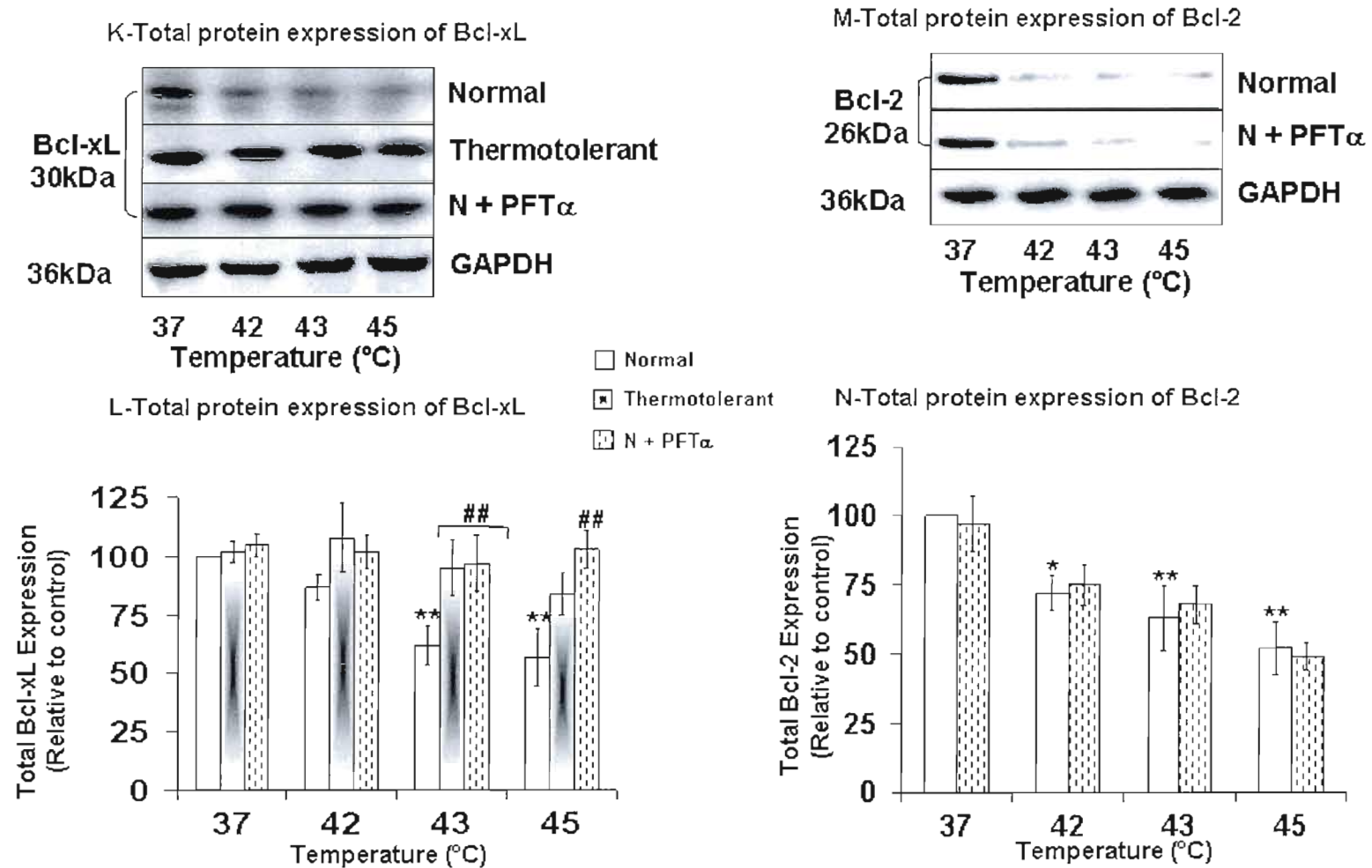


Figure 13K-N

Figure 14: Heat shock cell cycle arrest at G1/S phase

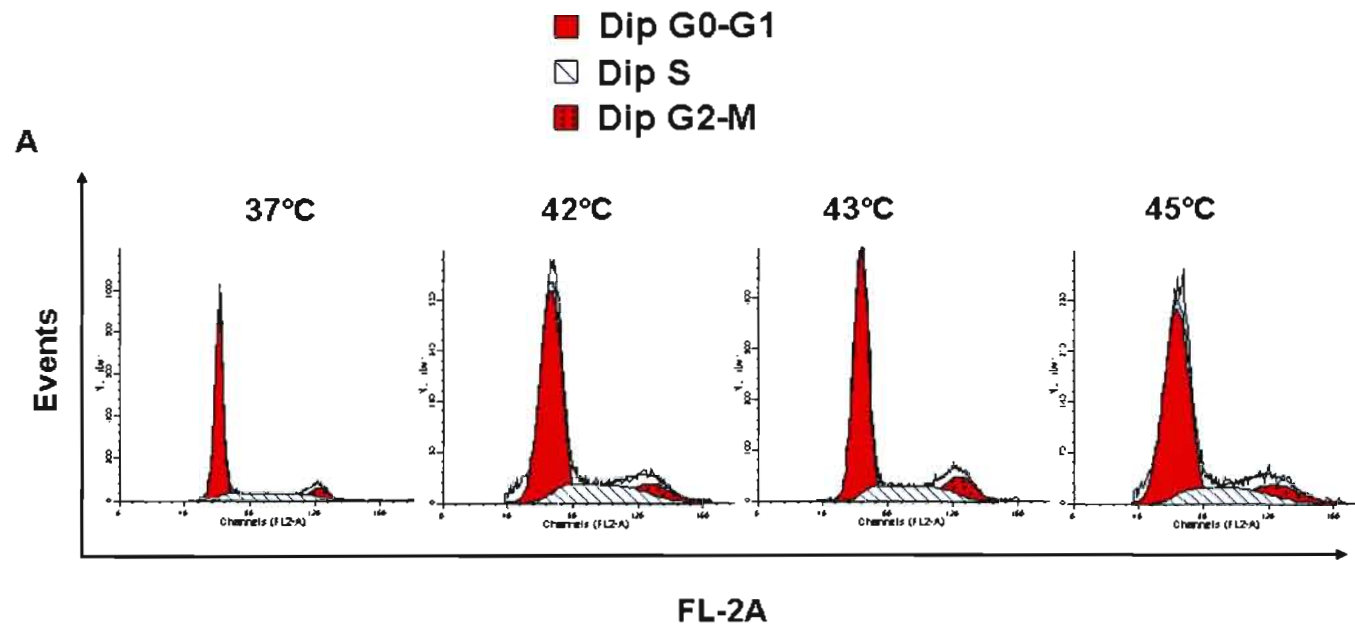


Figure 14A

Figure 14: Heat shock induces Cell cycle arrest at G1/s phase

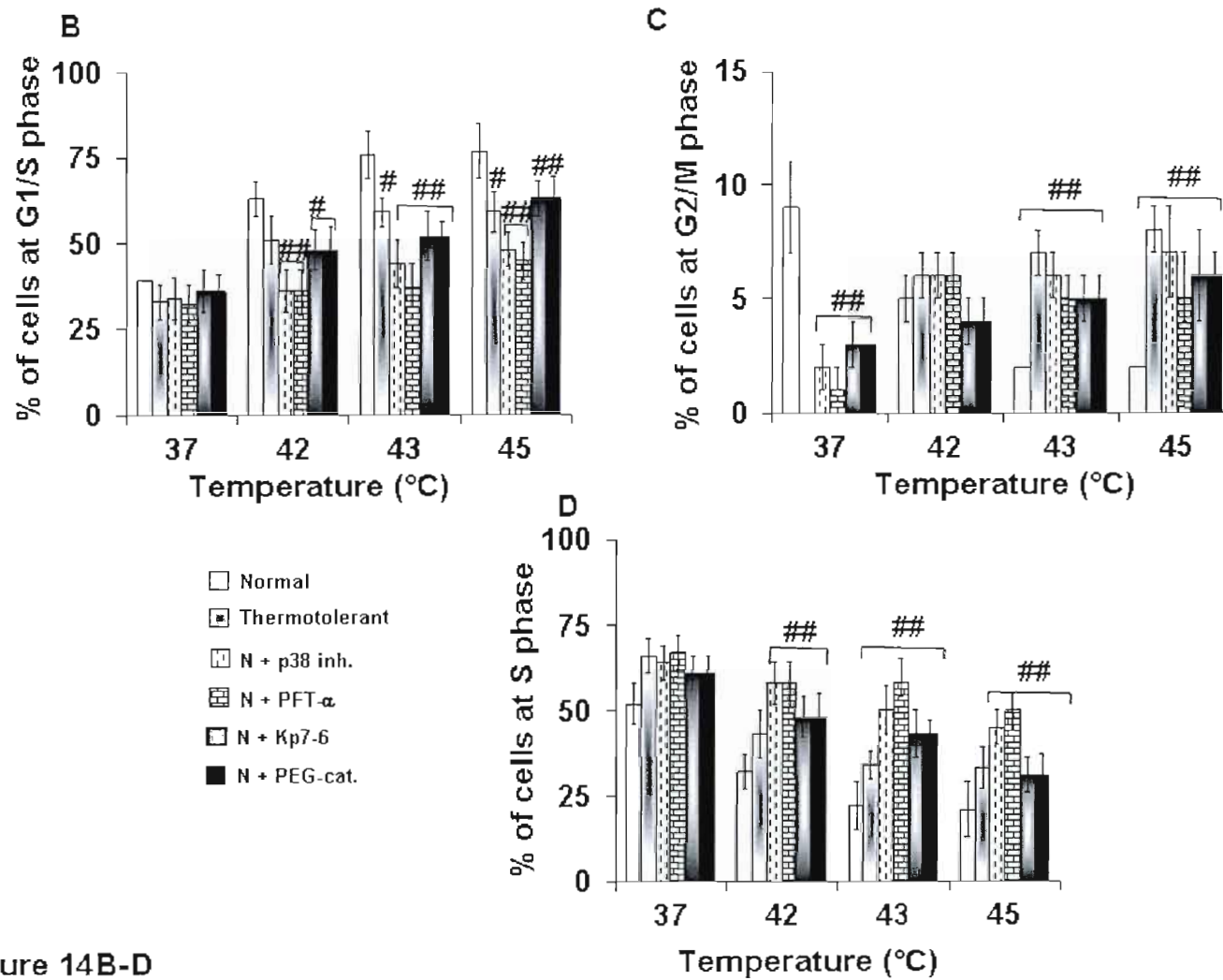
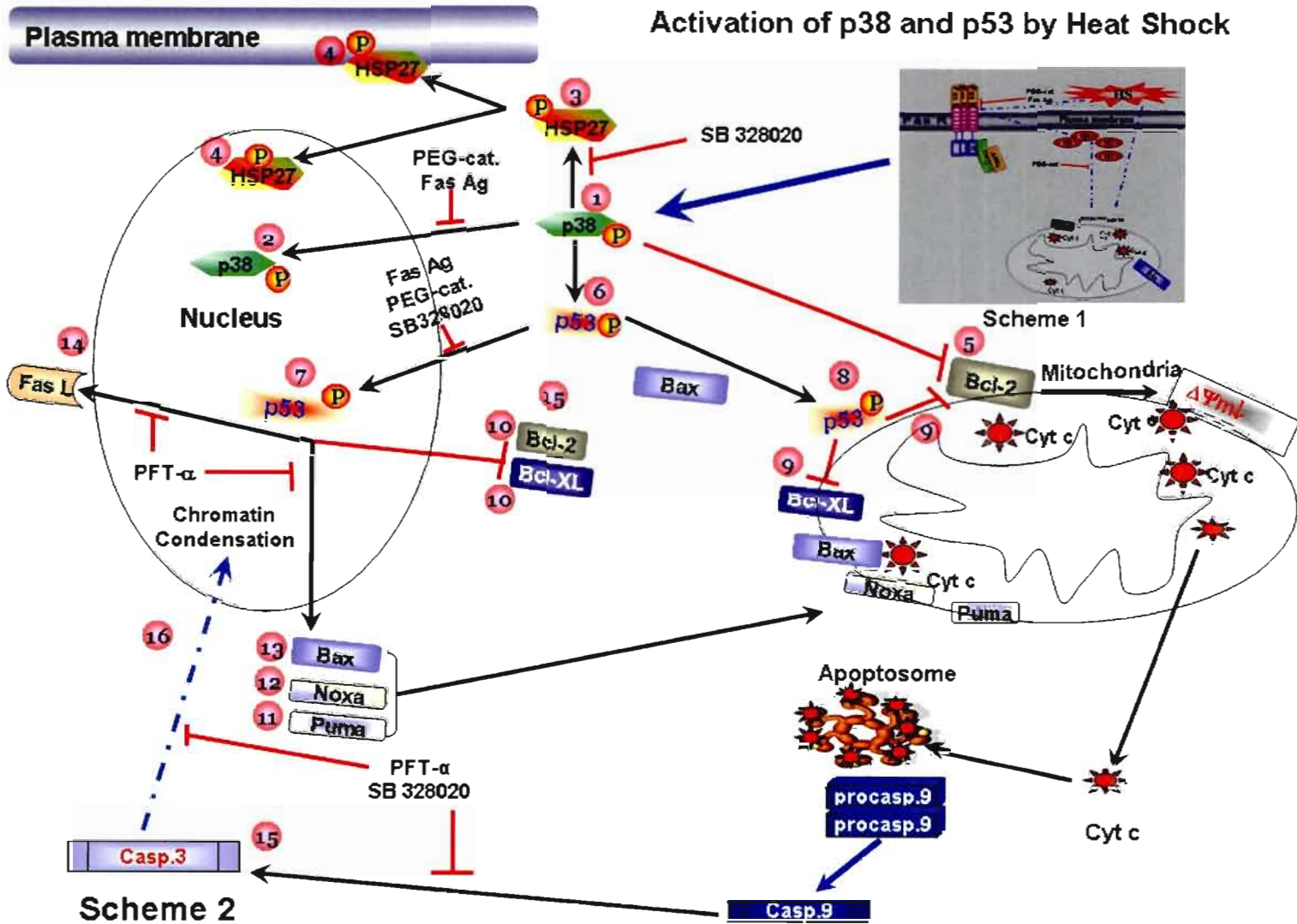


Figure 14B-D

Table 1: Heat shock induces cell cycle arrest

G1/S	Normal	Thermotolerant	N + p38	N + PFT	N + PEG-cat.	N + Kp7-6
37°C	39 ± 6	33 ± 5	34 ± 5	32 ± 6	36 ± 5	36 ± 5
42°C	63 ± 5	51 ± 7	36 ± 6	36 ± 6	48 ± 7	48 ± 6
43°C	76 ± 7	59 ± 4	44 ± 7	37 ± 7	52 ± 6	51 ± 6
45°C	77 ± 8	59 ± 6	48 ± 5	45 ± 5	63 ± 8	62 ± 7
G2/M	Normal	Thermotolerant	N + p38	N + PFT	N + PEG-cat.	N + Kp7-6
37°C	9 ± 2	0 ± 0	2 ± 5	1 ± 6	3 ± 0	2 ± 0
42°C	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 0	5 ± 1
43°C	2 ± 0	7 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
45°C	2 ± 0	8 ± 1	7 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 2
S	Normal	Thermotolerant	N + p38	N + PFT	N + PEG-cat.	N + Kp7-6
37°C	52 ± 6	66 ± 5	64 ± 5	67 ± 6	61 ± 5	62 ± 5
42°C	32 ± 5	43 ± 7	58 ± 6	58 ± 6	48 ± 7	57 ± 6
43°C	22 ± 7	34 ± 4	50 ± 7	58 ± 7	43 ± 6	44 ± 6
45°C	21 ± 8	33 ± 6	45 ± 5	50 ± 5	31 ± 8	38 ± 7



Article 3:

**HEAT SHOCK INDUCES APOPTOSIS MEDIATED BY THE
ENDOPLASMIC RETICULUM: PROTECTIVE EFFECT OF
THERMOTOLERANCE INDUCED AT A MILD TEMPERATURE OF 40°C.**

Ahmed Bettaieb¹ and Diana A. Averill-Bates^{1,2,*}

From Département des sciences biologiques¹, Université du Québec à Montréal, CP
8888, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Running head: Thermotolerance, MAPKs and heat-induced apoptosis

Address correspondence to: Diana A. Averill-Bates, PhD, Département des sciences
biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale Centre Ville,
Montréal, Québec, Canada H3C 3P8. Tel: (514) 987-3000(4811) Fax: (514) 987-
4647; Email: averill.diana@uqam.ca

²Formerly Dr. Diana Bates

Running head: ER stress-mediated apoptosis, hyperthermia and apoptosis

Keywords:

- **Hyperthermia**
- **Apoptosis**
- **Endoplasmic reticulum**
- **Thermotolerance**
- **Calcium**

Total number of text figures: 12

Total number of tables: 0

Contract grant sponsor: NSERC Canada; Contract grant number: 36725-05

Résumé :

Introduction : La réponse cellulaire aux différents types de stress, en particulier le choc thermique, fait l'objet de plusieurs travaux de recherche à travers le monde entier. Nos études précédentes ont montré qu'une exposition des cellules à un choc thermique doux a permis aux cellules de développer un état de thermotolérance et de résister à l'apoptose induite par un choc thermique subséquent plus sévère (42-45°C). Cet état de thermotolérance a été corrélé à l'expression de plusieurs protéines du choc thermique, en particulier les HSPs 27, 32, 72 et 90. Nous avons pu montrer également qu'un choc thermique létal induit l'apoptose via la voie du récepteur de mort Fas et la voie mitochondriale, indépendamment. De plus, Bid est clivé par la caspase 8 et la translocation de son fragment tronqué (tBid) au niveau de la mitochondrie amplifie le signal apoptotique. Par ailleurs, d'autres études ont montré que le choc thermique cause des dommages aux protéines et favorise leur agrégation.

Objectifs : L'hypothèse émise dans la présente étude à l'effet que l'aggrégation des protéines favorise leur accumulation au niveau du RE, ce qui génère un stress du RE a été validé. Sachant qu'un stress du RE pourrait induire la perte de l'homéostasie calcique et dépendamment de la sévérité du stress l'apoptose via la voie du RE, nous avons investigué cette possibilité. Nous avons également étudié l'effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C contre la toxicité d'un choc thermique subséquent létal.

Méthode : Des cellules cancéreuses issues d'un carcinome du col utérin (HeLa) ont été pré-incubées à un choc thermique doux (40°C) pour induire un état de thermotolérance transitoire avant d'être exposées à un choc thermique subséquent létal (42-45°C).

Résultats : L'exposition des cellules HeLa à un choc thermique létal (42 à 45°C) a induit une augmentation du taux d'expression de Bip et CHOP, une perte de l'homéostasie calcique résultant en l'augmentation du taux du calcium libre, l'activation des calpaïnes et des caspase 4 et 12. De plus, le choc thermique a induit une baisse du potentiel membranaire et l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Toutefois, l'inhibition de l'activité des calpaïnes et des caspases 4 et 12 n'a pas protégé les cellules contre la condensation de la chromatine et la fragmentation d'ADN. L'effet protecteur de la thermotolérance a été mis en évidence aussi bien au cours de la perte de l'homéostasie calcique que lors de l'activation des calpaïnes et des caspases 4 et 12.

Conclusion : Les résultats de cette étude suggèrent qu'un choc thermique létal active la voie du RE. Il s'avère également que l'induction de cette voie n'est pas requise pour l'induction de l'apoptose mais elle résulte d'un stress prolongé au niveau du RE. L'induction de la thermotolérance, par contre, a protégé les cellules contre l'induction de la voie du RE. L'ensemble de ces résultats témoigne de la capacité des cellules à s'adapter positivement aux variations de l'environnement cellulaire et à établir un état d'équilibre viable capable de contrarier non seulement le choc thermique mais également tout autre type de stress affectant l'homéostasie cellulaire.

Mots-clés : Hyperthermie, Thermotolérance, Stress du Réticulum Endoplasmique Apoptose, Caspase 12/4, Calpaïnes, Calcium.

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) plays a central role in the biogenesis of most extracellular and many organellar, post-translational modifications, and proper folding of proteins as well as their sorting and trafficking. It also plays a role in maintenance of intracellular calcium homeostasis, thus accumulation of unfolded proteins or alterations in intracellular calcium homeostasis cause ER stress. Prolonged ER stress leads to the induction of apoptosis. Heat shock is known to cause accumulation of aggregated proteins in the ER, but little is known about the severity of this stress and its links with apoptosis. The present work investigates the mechanisms of induction of endoplasmic reticulum-mediated apoptosis during heat shock, as well as the protective role of mild thermotolerance induced at 40°C. Exposure of human adenocarcinoma cervical HeLa cells to lethal thermal shock (42-45°C) increased the expression of CHOP. Heat shock also caused disruption of calcium homeostasis, resulting from intracellular calcium overload. This resulted in activation of the ER resident caspase 4 and caspase 12, as well as the calcium-dependent calpain proteases. Addition of calcium chelators (BAPTA, BAPTA-AM), caspase 7 inhibitor or calpain inhibitor demonstrated that activation of caspase 4 and 12 were a result of disrupted calcium homeostasis and that ER-mediated apoptosis was a consequence of prolonged ER stress. Moreover, thermotolerance afforded cellular protection against the disruption of calcium homeostasis and mitochondrial function, as well as heat shock-induced activation of proteases. These results suggest that thermotolerance induced at mild temperatures could prevent biochemical injuries and cytotoxicity caused by acute exposure to lethal temperatures and other biochemical stresses.

Keywords: Hyperthermia, Heat shock Proteins, Thermotolerance, Apoptosis, Endoplasmic reticulum, caspase 4/12, calcium, calpain.

Introduction

Hyperthermia is a promising new alternative used to treat a wide range of tumors, usually with minimal injury to normal tissues (van der Zee 2002). It is also known to be an immune system enhancer, is useful in providing pain relief and controlling bleeding, and is an effective therapy for other diseases such as prostatic hypertrophy and psoriasis (Fesneau et al., 2003; Bhowmick et al., 2004; Dayanc et al., 2008). Several major clinical studies have shown that hyperthermia can act as a potent modifier of tumor responses to radiation and chemotherapy by enhancing their toxicity. Hyperthermia has produced significant improvements in tumor response rates and patient morbidity, when used in combination with other treatments such as surgery, chemotherapy and radiotherapy, for cancers of the head and neck, cervix, rectum, breast, brain, bladder, lung, oesophagus and for soft-tissue sarcoma and melanoma (van der Zee 2002; Issels, Schlemmer et al. 2006; Fiorentini and Szasz, 2006). Unlike healthy tissues, tumors act as a heat reservoir when subjected to local hyperthermia. Since tumors are unable to increase blood flow to dissipate heat in response to thermal stress, they are more vulnerable to heat damage than the surrounding normal tissue (Issels, Schlemmer et al. 2006). This results in a collapse of the tumor's vascular system and destruction of the tumor cells.

Several different heating technologies have been developed such as local, regional and whole-body hyperthermia. Heating devices generally consist of applicators of ultrasound or electromagnetic energy, microwave antennas, implantable needles, radiofrequency electrodes, submicron magnetic particles (Yanase, Shinkai et al. 1998) and more recently, technology using gold nanoparticles that kill tumor cells upon laser irradiation (Everts 2007). The effectiveness of these antitumor technologies is related to the temperature achieved during the treatment, as well as the length of treatment and cell and tissue characteristics (Hildebrandt, Wust et al. 2002; van der Zee 2002).

However, despite success in the cancer clinic, the mechanisms involved in heat-induced toxicity are not yet fully understood. Hyperthermia causes damage to multiple cellular targets such as cell membranes, the cytoskeleton, mitochondria and nuclei, as well as damage to proteins including unfolding, exposing hydrophobic groups, and aggregation (Edwards 1998; Roti Roti 2007; Roti Roti 2008). Several studies reported induction of apoptosis in response to heat (Khan and Brown 2002; Vertrees, Das et al. 2005; Moulin and Arrigo 2008). We previously reported that hyperthermia (42-43°C) induced the mitochondrial pathway of apoptosis in HeLa cells and at higher temperature (45°C) cell death occurred by necrosis (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Several other studies reported the involvement of the mitochondrial pathway with a loss of mitochondrial membrane potential, an increase in superoxide anion production and the activation of intracellular caspase 3 (Arai, Kondo et al. 2002) in heat shock-induced apoptosis. Alterations of mitochondrial functions occurred in tumor cell lines such as L929-11E, cell carcinoma and melanoma (Ko, Yuen et al. 2000; Yuen, Fung et al. 2000; Shellman, Howe et al. 2008), as well as in cardiomyocytes and normal tissues (Fajardo 1984). In lung cancer cells, hyperthermia induced activation of membrane death receptors of the tumor-necrosis-factor family (Vertrees, Das et al. 2005). However, it was suggested that caspase 2 could be a major mediator of heat shock-induced apoptosis in mouse embryonic fibroblasts (Bonzon, Bouchier-Hayes et al. 2006; Tu, McStay et al. 2006).

Apoptosis and necrosis are the best described mechanisms of cell death. They are induced by a variety of stresses in a concentration and time dependent manner (Helewski et al., 2006). Apoptosis and necrosis differ in their morphological and biochemical features. Three apoptotic signaling pathways have been described: the extrinsic pathway mediated by death receptors and two intrinsic pathways mediated by mitochondria and more recently, the endoplasmic reticulum (ER) (Gradzka I.,

2006). The induction of these pathways results in activation of caspases (Alnemri et al., 1996; Ashkenazi and Dixit, 1998), which cleave cellular proteins and are responsible for many of the morphological changes associated with apoptosis such as membrane blebbing, chromatin condensation, DNA fragmentation and cytoplasmic shrinkage (Shroff et al., 2007).

The ability of the ER to sense and respond effectively to physiological stress conditions and environmental insults leads to an adaptive cellular survival response that maintains the homeostasis of the ER, known as the unfolded protein response (UPR) (Urade 2007). The UPR is a highly conserved stress response that involves the transcriptional induction of UPR genes (Urade 2007), the translational attenuation of global protein synthesis (Paschen 2004) and ER-associated degradation (ERAD) to remove the misfolded proteins (Foufelle and Ferre 2007).

When ER stress becomes too severe and prolonged, induction of growth arrest and apoptosis occurs in many cell types, most probably because of downstream effects of the activated transcription factor C/EBP-homologous protein (CHOP)/GADD153 (Wang et al, 1996). Induction of apoptosis through the ER can occur by several mechanisms including the activation and nuclear relocalization of caspase 12 or activation of the protein kinase JNK via the apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1)/inositol-requiring (IRE-1) protein kinase1/TNF receptor-associated factor 2 (Traf-2) complex. In addition, during ER-mediated apoptosis, intracellular levels of free calcium in the cytosol often increase, which leads to activation of calpains and subsequent cleavage of the anti-apoptotic Bcl-2 family protein Bcl-xL (Nakagawa and Yuan, 2000). Apoptosis through the ER may also activate the mitochondrial pathway via cross-talk between these cellular compartments (Szegezdi et al., 2006). The crosstalk mainly involves Bcl-2 family members and usually leads

to cytochrome c release as well as caspase 9 and 3 activation (Pinton and Rizzuto, 2006).

The induction of ER-mediated apoptosis by heat shock has not been investigated, although Kwon and colleagues, briefly described an ER response of thyrocytes to 3h heat shock exposure (43°C) (Kwon, Choi et al. 2001). It was also reported that hyperthermia induces release of Ca²⁺ from intracellular stores resulting in an increase in the intracellular Ca²⁺ levels (Arai, Kondo et al. 2002). Calcium has been reported to regulate apoptosis through the mitochondrial pathway by calcium-dependent enzymes, stimulating nitric oxide production, mitochondrial permeability pore transition (mPTP) opening, or calcium-induced osmotic swelling/rupture of mitochondrial membranes (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003; Vindis, Elbaz et al. 2005; Giulivi 2007). It is therefore possible that calcium could participate in ER-mediated apoptosis and/or further enhance activation of the mitochondrial caspase-dependent pathway in apoptosis induced by hyperthermia.

The aim of this study is to investigate whether lethal heat shock (42-45°C) can induce ER-mediated apoptosis and whether calcium and proteases such as calpain and caspases 12 and 4 might play a role. We also determine whether mild hyperthermia induced at fever range temperature (40°C) can protect human cervical carcinoma HeLa cells against apoptosis induced at lethal temperatures.

Material and Methods

Chemicals and reagents- Media, sera and trypsin for cell culture were purchased from Gibco Canada (Burlington, ON). Primary antibodies (PARP, ICAD, caspase 9, anti-caspase 3, Bax, Bik, Bak, Bim, Noxa, Puma, Bcl-2, Bcl-xL, cytochrome c, Lamin A and GAPDH) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Secondary antibodies (goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal anti-mouse IgG, HRP-conjugated rat MAb-anti-rabbit or rabbit HRP-conjugated polyclonal anti-goat IgG) were acquired from Biosources International (Camarillo, CA). Primary GST π 1 and calnexin antibodies, caspase 4 substrate (Ac-LEVD-AFC), caspase 3 substrate (Ac-DEVD-AMC), calpain substrate (Suc-LY-AMC), caspase 4 inhibitor (LEVD-CHO), caspase-3/7 inhibitor I (5-[(S)-(+)-2-(methoxy-methyl)pyrrolidino]sulfonylisatin) and general caspase inhibitor (Z-VAD.fmk) were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Caspase-12 fluorometric assay kit was from BioVision (Mountain view, CA). Chemical reagents such as dithiothreitol (DTT), percoll, digitonin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitors cocktail, sodium deoxycholate, Triton X-100, ethylene glycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sodium fluoride (NaF), O,O'-bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), O,O'-bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM), Hoechst 33258, propidium iodide (PI) and calpain inhibitor (Ac-LLnL-CHO) were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Finally, primary cytochrome oxidase antibody, 1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, penta-acetoxymethyl ester (Fluo-3-AM), 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H2DCF-DA), dihydro-ethidine, carbonylcyanide-trifluoromethoxyphenylene hydrazone (FCCP) and 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine-iodide (JC-1) were purchased from Molecular Probes

(Eugene, OR). Caspase 12 substrate (Ac-ATAD-AFC) was purchased from MBL International (Constitution Way Woburn, MA).

Cell culture- Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (ATCC no. CCL-2) were cultured as monolayers in Eagle's modified Dulbecco medium supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) and 10% foetal bovine serum (Gibco Canada, Burlington, ON) at 37°C and 5% CO₂ (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Medium was replaced with fresh medium 24 h prior to experiments. Cells were harvested using 0.5mg/ml trypsin/0.2mg/ml EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1 000xg, 3 min). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3h, evaluated by trypan blue exclusion (data not shown).

Heat treatment- To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to an incubator for 3h at 40°C ± 0.1°C, following a period of 20 min to allow the temperature of the culture medium to reach 40°C (Przybytkowski, Bates et al. 1986). Non-thermotolerant cells were pretreated with extracellular calcium chelator BAPTA (100 µM) or cell-permeable chelator BAPTA-AM (100 µM), or inhibitors of caspase 12 (10 µM), caspase 4 (20 µM), calpain (10 µM) or caspases 7/3 (50 µM), as indicated. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were heated (37-45°C) for 3h in temperature-controlled waterbaths (±0.02°C) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC), allowing 3 min for the cell suspension to reach the appropriate temperature.

Intracellular free Ca²⁺ measurement- The Ca²⁺-sensitive fluorescent indicator, Fluo-3-AM was used as described previously (Jakubczak et al., 2007) with modifications. Cells were preloaded, with or without extracellular calcium chelator BAPTA (100 µM) or intracellular chelator BAPTA-AM (100 µM), for 2h. Cells were

then heated for 2h at 42- 45°C in fresh medium. Only BAPTA was kept during heat treatment. As a positive control for Ca²⁺ release from ER stores, A23187 (5 µM) was added to cell preparations for 30 min. Cells were then loaded with 5 µM Fluo-3-AM for 45 min at 37°C in the dark. Cells were thereafter washed with PBS and stained with 25µM propidium iodide (PI). Fluo-3-AM fluorescence was detected using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) equipped with an argon ion laser (488 nm) using Cell Quest Software. Data (10,000 cells) were collected for emission intensity at wavelengths of 530 nm for Fluo-3 (FL-1) and 682 nm for PI (FL-3). Only live cells with a low PI fluorescence were analyzed.

Morphological analysis of apoptosis- Following heat treatment, apoptotic cells were stained with Hoechst 33258 (50 µg/ml) (blue-green fluorescence) and necrotic cells were stained with PI (50 µg/ml) (red fluorescence) (Bettaieb and Averill-Bates 2005). Cells were visualized by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC). For each condition, at least 200 cells were counted. The percentages of apoptotic or necrotic cells were calculated relative to total cells (obtained using bright field illumination).

Western blot analysis of protein expression- After heat treatment, cells were lysed in buffer T (Samali, Cai et al. 1999) containing 100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 mM DTT, 5% freshly added percoll, 0.01% digitonin, 1 mM PMSF and cocktail of protease inhibitors (pH 7.4). Thereafter, debris, unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation (10,000g, 10 min). Proteins (30 µg) (Bradford 1976) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8%-12%) (Laemmli 1970) and immunodetected using primary antibodies recognizing PARP (1:500), µcalpain (1:1000), caspase 12 (1:1000), caspase 4 (1:1000), ICAD (1:2000), procaspase-7 (1:1000), Noxa (1:1000), Puma (1:1000), Bcl-xL (1:1000), Bax (1:1000), Bim (1:1000), Bik (1:1000), Bak (1:1000), vinculin

(1:1000), Bip (1:2000) and CHOP (1:500) (Bettaieb & Averill-Bates, 2005). Protein expression was analysed using IPGEL software, relative to GAPDH (1: 5000) loading controls.

Subcellular fractionation- Following heat treatment, fractionation was performed as described previously (Bettaieb & Averill-Bates, 2005) with modifications. Cells were washed with cold buffer W (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4) and resuspended in lysis buffer F (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 DTT, 5% freshly added percoll, 0.01% digitonin, 1 mM PMSF and cocktail of protease inhibitors, pH 7.4). Membranes were broken using a dounce homogenizer (200 strokes/sample). Debris and unbroken cells were removed by centrifugation (500g for 10 min) and supernatants were then centrifuged (2 500g, 5 min) to separate nuclei (pellet). Supernatants were then centrifuged (15 000g, 15 min) to separate mitochondria. Supernatants were centrifuged (100 000g, 1h) to separate cytosolic and microsomal (pellet) fractions. Nuclear, mitochondrial and microsomal fractions were resuspended in lysis buffer T. Cellular distribution and translocation of different proteins (30 µg) were analysed by SDS-PAGE and Western blotting. Purity of nuclear, microsomal, cytoplasmic and mitochondrial fractions was verified using antibodies against lamin A, calnexin, GST π 1 and cytochrome c oxidase, respectively.

Mitochondrial membrane potential (MMP)- Following heating (3h, 37-45°C), cells were incubated with JC-1 (5 µM) (Molecular Probes) for 30 min at 37°C (Darzynkiewicz, Bruno et al. 1992). Data were collected using a FACSScan flow cytometer. Forward and side scatters were used to establish size gates and exclude cellular debris from the analysis. JC-1 emission was collected on FL-1 and FL-2 channels at 530 (\pm 20) nm and 590 (\pm 20) nm, respectively. Cells (10,000) were

analyzed for each sample in FL-1 and FL-2 channels, after removing PI-stained necrotic cells (FL-3; 620 ± 15 nm).

Caspase activity- Following heat treatment in cells that were pre-incubated with or without calcium chelators, inhibitors of calpain or caspase 3/7, caspase activity was determined as described previously (Stennicke & Salvesen, 1997; Bettaieb & Averill-Bates, 2005). Briefly, cells were centrifuged using a microfuge (3000 rpm, 3 min) and resuspended in reaction buffer (26 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 133 mM NaCl, 13 mM DTT, 1,3 mM EDTA, 0.13% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonic acid (CHAPS), 13% sucrose, pH 7.2). Cells were lysed at -20°C for 30 min and then appropriate caspase substrates (50 μM) were added. Caspase 9, 3 and 4 activities were measured by cleavage of Ac-LEHD-AFC, Ac-DEVD-AMC and Ac-LEVD-AFC, respectively. The release of fluorescent products AFC or AMC was monitored during 30 min using a spectrofluorimeter (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with an excitation wavelength of 400 nm and emission wavelength of 505 nm for AFC or 380/460 for AMC. Caspase 12 activity was monitored using a caspase 12 fluorometric assay kit. Activities of caspases are represented as a relative cumulative fluorescence of the kinetic reaction and compared to untreated controls.

Calpain activity- Calpain activity was monitored by measurement of AMC release using general calpain substrate Suc-LY-AMC, as described for caspase activity.

Immunoprecipitation- Following heat treatment, cell lysates were prepared by extraction with cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, and 1% Triton-X, pH 7.5 supplemented with protease inhibitor for 30 min at 4°C . Debris was removed from

lysates by centrifugation at 15,000g for 10 min. For immunoprecipitation (Harlow and Lane, 1999), lysates were incubated with 50 μ l of protein A-agarose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) precoated with rabbit anti-IRE-1 polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for 2h at 4°C. The beads were washed three times with RIPA buffer and the appropriate proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE and Western blotting.

Statistics- Data represent means \pm SEM from at least 3 independent experiments. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups (comparison of curves for thermotolerant versus non-thermotolerant cells; cells \pm caspase or calpain inhibitors, calcium chelators) were made by one-way analysis of variance (ANOVA). The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ($\alpha=5\%$). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). For significant differences, $P<0.05$.

Results

Heat shock induces the expression of CHOP/GADD153

Exposure of HeLa cells to lethal heat shock (42-45°C) for 3h led to a significant increase in expression of CHOP in cell lysates (Figure 1A-B) and in the nuclear fraction (Figure 1C-D), compared to controls at 37°C. The heat induction of CHOP expression was diminished in thermotolerant cells (3h, 40°C).

Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins

Several pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family such as Bax, Bak, Bim and Bik were shown to play a role in ER stress-mediated apoptosis and suppress the anti-apoptotic activity of other Bcl-2 family proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL (Heath-Engel et al., 2008). The intracellular localization of these proteins is key for their activity. To analyze the intracellular re-localization of different anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins in HeLa cells exposed to hyperthermia, post-nuclear extracts of cells were fractionated into the heavy membrane (mitochondria-rich), S300 (cytosol), and light membrane (ER-rich) fractions (Figure 2A-D). Purity of fractions was confirmed using marker proteins representing the nuclear, mitochondrial, cytosolic and ER-rich fractions: lamin A, COX, GST π 1 and calnexin, respectively (Figure 2E).

First, changes in expression of Bcl-2 family proteins were evaluated in whole cell extracts (Figure 2A). Interestingly, hyperthermia (42-45°C) caused a decrease in expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, compared to controls at 37°C (Figure 2F-H; Figure 2I-L). In thermotolerant cells, on the other hand, these decreases in expression of anti-apoptotic proteins were significantly attenuated (Figure 2A).

Bim has three distinct isoforms; Bim (short) (Bim-S) is constitutively pro-apoptotic, whereas Bim (long) (Bim-L) and Bim (extra long) (Bim-EL) can be expressed in healthy cells in an inactive form (O'Connor et al., 1998). Heat (42-45°C) caused a significant increase in expression of pro-apoptotic proteins Bim-S, Noxa and Puma in whole cell lysates (Figure 2Y-Z9), and small increases in Bax and Bik (Figure 2M-P; Figure 2U-X), compared to controls (37°C) (Figure 2A). Bak, Bim-L and Bim-EL were not affected by hyperthermia (Figs. 2A-D). Thermotolerance induced at 40°C significantly reversed these heat-induced changes in expression of Bim-S, Noxa and Puma, therefore protecting membrane integrity and cellular homeostasis (Figure 2Y-Z9).

Figs. 2B-D show that hyperthermia alters subcellular location of several Bcl-2 family proteins, compared to controls at 37°C. Bcl-2 is absent in the cytosol of HeLa cells (Figure 2B), in agreement with previous work (Nomura et al., 1999). Bcl-2 is localized in mitochondrial and ER-rich fractions and its levels decreased significantly in these compartments during hyperthermia (42-45°C) (Figure 2C-D; Figure 2F-H). Bcl-2 levels did not increase in cytosolic (Figure 2B) or nuclear fractions (data not shown), suggesting that Bcl-2 does not translocate to other compartments, but rather, undergoes degradation during heat shock. Similar significant decreases occurred for Bcl-xL levels in the mitochondrial and ER-rich compartments during heat shock (Figure 2C-D, Figure 2I-K). However, unlike Bcl-2, Bcl-xL was present in the cytosol, where its levels also decreased during hyperthermia (42-45°C). Hyperthermia (42-45°C) caused a significant decrease in levels of the pro-apoptotic proteins Bax, Bak, Bik and Bim-S in the cytosol (Figure 2B), while there were corresponding increases in their levels in the mitochondrial and ER-rich fractions (Figure 2C-D). During heat shock (42-45°C), levels of pro-apoptotic proteins Noxa and Puma decreased significantly in the cytosol, with corresponding increases in the mitochondrial fraction (Figure 2B-C). Puma and Noxa were not detected in ER-rich

fractions (Figure 2D). Together, these findings show that hyperthermia causes an imbalance between anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins at the mitochondrial and ER membranes, therefore sensitizing cells to apoptosis. A pro-apoptotic imbalance results in disruption of membrane function as well as increased permeabilization, which usually leads to release of pro-apoptotic factors such as cytochrome c from mitochondria or calcium from the ER. It is important to note, for all these proteins, the role of mild thermotolerance induced at 40°C in protecting the cell from intracellular relocation of pro-apoptotic members or degradation of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Figure 2B-D).

Heat shock induces disruption of calcium homeostasis

Given that hyperthermia caused a pro-apoptotic imbalance at the ER, we investigated whether this could result in disruption of calcium homeostasis and ER-mediated apoptosis. Disruption of calcium homeostasis could be a consequence of cellular influx of extracellular calcium across the plasma membrane and/or calcium release from intracellular pools such as the ER. Exposure of HeLa cells to heat shock (42-45°C) for 2h caused a significant increase in intracellular free calcium (Ca^{2+}_i) levels, compared to controls at 37°C (Figure 3A,C). The highly selective calcium ionophore A23187 served as a positive control for mobilization of Ca^{2+}_i from ER stores (Figure 3C). There was significant reversal of these increases in Ca^{2+}_i in thermotolerant cells (Figure 3B,C).

It has been reported that calcium from both intracellular and extracellular sources can contribute to apoptosis (Bernardi and Rasola, 2008). To identify the source of calcium during hyperthermia-induced calcium deregulation, cell-permeable calcium chelator (BAPTA-AM) and its non-permeable form (BAPTA) were used. When cells were incubated with the non-permeable chelator BAPTA, before and during heat shock, Ca^{2+}_i levels increased to a lower extent by 1.5-fold at 42°C. Pretreatment of cells with BAPTA-AM led to lower increases in Ca^{2+}_i levels by 1.4-fold at 42°C. BAPTA-AM was removed during heat shock treatment to avoid chelating extracellular calcium once it enters cells. However, neither BAPTA nor BAPTA-AM used alone was able to completely prevent the heat-induced increase in Ca^{2+}_i levels. These results suggest that calcium from both intracellular and extracellular sources is involved in disruption of calcium homeostasis by heat shock.

Heat shock activates calpain proteases

Disruption of calcium homeostasis is known to activate calcium-dependent cysteine proteases known as calpains. Ubiquitous μ and μ -calpains have been implicated in apoptosis. Calpains are widely distributed in the cytosol and their levels increase at membranes in response to signals such as calcium (Gil-Parrado et al., 2003). Activity of μ and μ -calpains is modulated by a specific endogenous inhibitor, calpastatin. Heat shock (42-45°C) caused cleavage of calpastatin (126kDa) to generate two cleaved fragments of 110kDa and 92kDa, compared to controls at 37°C (Figure 4A-D). Mild thermotolerance significantly attenuated heat shock-induced cleavage of calpastatin. Similar to calpastatin, hyperthermia caused cleavage of native μ -calpain (110kDa) with a concomitant increase in the cleaved active form (86kDa) (Figure 5A-C). In controls at 37°C, calpain and its cleavage fragment were not detected in the ER-rich fraction (Figure 5D). However, during heat shock, there was re-localisation of the 86kDa fragment to the ER (Figure 5D,E). Hyperthermia (42-45°C) caused a significant increase in calpain enzymatic activity (Figure 5F). Ionomycin was used as positive control for calpain activation. In thermotolerant cells, calpain cleavage, ER re-localization of the cleaved fragment and increased enzymatic activity during heat shock were significantly diminished (Figure 5A-E). Both BAPTA and BAPTA-AM inhibited the heat-induced increase in enzymatic activity (Figure 5F), which indicates that both intracellular and extracellular sources of calcium are involved in calpain activation.

The cytoskeletal protein vinculin is a substrate of calpains. The intensity of vinculin (110kDa) expression decreased significantly in cells exposed to hyperthermia (42-45°C), compared to controls at 37°C (Figure 6A,B). There was formation of a 90kDa cleavage fragment, which was significantly attenuated at 42-43°C in thermotolerant cells (Figure 6A,C). Inhibition of vinculin cleavage was also

obtained when cells were pre-incubated with calpain inhibitor (Figure 6A-C), which confirms that calpain mediates vinculin cleavage during heat shock.

Heat shock induces calcium independent disruption of mitochondrial membrane potential

Heat shock is known to cause mitochondrial membrane depolarisation in HeLa cells (Bettaieb and Averill-Bates, 2005). We determine here whether mitochondrial membrane depolarization could arise from disruption of calcium homeostasis, using calcium chelators. Heat shock (42-45°C) caused a significant loss of mitochondrial membrane potential (MMP) compared to controls at 37°C, assessed using the carbocyanine JC-1 (Figure 7). FCCP was used as positive control for loss of MMP. However, cells pre-treated at 40°C showed increased membrane potential at 37 to 43°C, but not at 45°C (Figure 7). The calcium chelators BAPTA and BAPTA-AM reversed the loss of MMP at 42°C, but had little effect at higher temperatures (Figure 7).

Hyperthermia activates caspases 4 and 12: role of calcium

Caspase 12 activation is one of the hallmarks of ER-mediated apoptosis. Deregulation of calcium homeostasis and activation of m and μ -calpains have been shown to be involved in the induction of caspase 12. It was reported that the human caspase-12 gene contains several mutations, which make it functionally inactive and it has been suggested that caspases-4 and 5 may be the functional counterparts of murine caspase-12 in human cells (Lamkanfi et al., 2004). Conversely, proteolytic cleavage and activation of caspase 12 was reported recently in HeLa cells (Hu et al., 2005). Indeed, hyperthermia (42-45°C) caused a decrease in expression of pro-caspase 12 (55 kDa), as well as increases in the active cleavage fragments for caspase-12 (42 kDa) (Figure 8A-B) and caspase-4 (20 kDa) (Figure 8C-D). Cleavage of caspase-12 was prevented in thermotolerant cells that were treated for 3h at 40°C

(Figure 8A,B). For caspase-4, cleavage at 42-43°C was inhibited in thermotolerant cells (Figure 8C,D). Together with procaspase cleavage, enzymatic activities of caspases-12 and -4 increased significantly in HeLa cells at 42 to 45°C (Figure 9A,B). Thermotolerance induced at 40°C attenuated the activation of both caspases.

We subsequently investigated the role of calcium in the activation of caspases 12 and 4. Several authors described the mechanisms of caspase 12 activation. Apart from its direct activation by calcium-activated calpains, an interaction between the transmembrane serine/threonine protein kinase stress sensor molecule IRE1 located at the ER and procaspase 12 leads to the activation of caspase 12 through ASK-1 and the adaptor molecule Traf-2. Procaspase 12 can also be cleaved and activated by the active cytosolic caspase 7. To address these issues, we first analyzed the role of calcium in activation of caspases in ER-mediated apoptosis during heat shock. Indeed, the calpain inhibitor reduced the activation of caspase 12 and caspase 4 caused by heat shock (42-25°C for caspase-12; 42-43°C for caspase-4). Similarly, both calcium chelators BAPTA and BAPTA-AM inhibited the activation of these caspases (Figure 9A,B), suggesting that deregulation of calcium homeostasis and calpain activation are key factors for the activation of caspase 12 and caspase-4.

As shown in Figure 9C, heat shock caused an increase in caspase 7 enzymatic activity. However, an inhibitor of caspase 7 did not reduce caspase 12 or 4 activities (Figure 9A,B), which excludes the hypothesis of direct activation of these caspases by caspase 7. We subsequently investigated the role of ASK-1 and Traf-2 in caspase-12 activation (Figure 10). Exposure of HeLa cells to heat shock did not significantly affect levels of ASK-1 (Figure 10A-D) or Traf-2 (Figure 10C-H) at the ER membrane or in the cytosol. In order to see if caspase 12 binds to an IRE1/Traf-2 complex, immunoprecipitation of IRE-1 protein was assessed using Ire-1 antibody. Neither procaspase 12 nor ASK-1 nor Traf-2 was bound to IRE-1, suggesting that caspase 12

is activated through other mechanisms than an IRE-1/Traf-2 complex (Figure 10I). Together, these results show that activation of both caspase 4 and caspase 12 is calcium dependent and activated mainly by calcium-activated calpains.

Finally, we determined whether calcium plays a role in the execution phase of apoptosis during heat shock heat, or if there are other factors or mechanisms contributing to this phase. Hyperthermia (42-43°C) activated the downstream effector caspase 3 (Figure 11) and caused nuclear chromatin condensation (Figure 12A). BAPTA, BAPTA-AM and calpain inhibitor caused small decreases in caspase-3 activation, but none of these compounds was able to inhibit completely heat shock-induced activation of caspase 3 (Figure 11). Hyperthermia-induced chromatin condensation was also partially inhibited by BAPTA and BAPTA-AM at 42 and 43°C (Figure 11C,D,I). However, calpain inhibitor had no effect (Figure 11E,I). Furthermore, chromatin condensation was also partially diminished by inhibitors of caspase 12 and caspase 4 at 42 and 43°C (Figure 11F,G,I). Caspase-3 activation (Figure 11) and chromatin condensation (Figure 12B,I) were significantly decreased in thermotolerant cells. These findings suggest that induction of caspase 3 activity and chromatin condensation by heat shock are partially dependent on disruption of calcium homeostasis and apoptosis mediated by the ER. However, other pathways are involved in heat-induced apoptosis.

Discussion :

Hyperthermia is known to be cytotoxic at temperatures above 41° C and selectively lethal to cancer cells, while mild hyperthermia (39 to 40,5°C) is known to be beneficial to tissues and organs (van der Zee J et al., 2002). It has been reported that mild hyperthermia correlates with the transient expression of several heat shock proteins that are able to protect cells not only against lethal hyperthermia but also against several other stresses such as stress due to heavy metals and injuries caused by reactive oxygen species (Baronzio G et al., 2007). In the present study we assessed both kinds of hyperthermia (non-lethal and lethal) in order to better understand the mechanisms involved in cellular response to the variation of temperature. Since hyperthermia is used as an alternative technique to surgery and chemotherapy in treatment of cancer, the aim of this study was to improve our knowledge about how hyperthermia acts. We hypothesized that with the use of both lethal and non-lethal hyperthermia we can improve cancer treatment by increasing the death of tumor cells and enhancing the resistance of healthy cells to cytotoxic effects of classic methods of cancer treatment.

This is the first report to show the involvement of ER stress, specifically seen as caspase-4 and -12, as well as CHOP, Puma and Noxa, in heat shock-induced apoptosis. This report provides also novel evidence of heat shock-induced apoptosis and its molecular mechanisms in HeLa cells. We confirmed here that heat shock-induced ER stress-mediated apoptosis upon thermal stress is likely explained by the disruption of calcium homeostasis. Specifically, we have demonstrated that heat shock-induced ER stress mediated apoptosis (a) activates the UPR leading to increased expression of CHOP, (b) induces proteolytic cleavage of procaspases 12 and 4, (c) enhances the loss of mitochondrial membrane integrity and (d) increases

the presence of several members of BH3 only Bcl-2 family. Consistent with our previous results (Bettaieb and Averill-Bates, 2005), thermotolerance induced at 40°C conferred a protective effect in HeLa cells against subsequent heat shock-induced apoptosis. A significant increase in the ER resident chaperone Bip/GRP 78 was observed in thermotolerant cells.

This is also the first report to show that heat shock-induced apoptosis is not exclusively dependent on one unique pathway of apoptosis. The role of Bcl-2 family member in heat shock-induced apoptosis is at present unclear. The localization of these proteins is the key for their activity. It is generally accepted that translocation of cytosolic Bax to the mitochondria is the critical cause of mitochondrial membrane depolarization which results in cytochrome c release and caspase-9 activation. However, Bax is not the only protein that translocates to the mitochondria upon thermal stress. For example, Bim, which in normal conditions is associated with cytoplasmic dynein, thereby inhibiting its apoptotic signalling, translocates to mitochondria to induce the intrinsic pathway under specific circumstances. Similarly, translocation of Bim to the ER membrane in response to ER stress is an important step towards activation of caspase 12 and initiation of the ER mediated apoptosis in Bim transfected C2C12 murine myoblast cells (Morishima et al., 2004). The same study also showed that Bcl-xL can suppress ER stress induced apoptosis not by a direct effect on the mitochondrial outer membrane but by sequestration of cytoplasmic pro-apoptotic members of the same family. Alternatively, Mathai et al. (2005) showed that the release of Ca^{2+} from the ER store requires the recruitment of Bak and Bax to the ER membrane in baby mouse kidney cells. This Bax, Bak-dependent release of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum stores is regulated by the BH3 only protein Bik and requires conformational changes.

Bik was also shown to initiate an early release of Ca^{2+} from ER upstream of the activation of effector caspases. Moreover, ER stress-induced apoptosis may be mediated by expression of Puma and Noxa. The expression of these two members of the BH3 only bcl-2 protein family, in addition to Bax and Bid, is known to be up-regulated by p53. Several studies showed a role of Puma and Noxa in permeabilization of the outer membrane of the mitochondria and the ER. Similarly, both Bax and Bak, are known to induce permeabilization of the mitochondrial outer membrane through an intramembranous homo-oligomerization. Evidently, antiapoptotic members of the Bcl-2 family exert their antiapoptotic actions either by heterodimerization with pro-apoptotic members, especially BH3 only proteins, or by directly protecting mitochondrial membrane integrity. Bcl-2 protein is also found at the ER (in addition to mitochondria and nuclear membrane), and its over-expression resulted in ER calcium release. A controversial study showed that the subcellular location Bcl-2 protein may influence its antiapoptotic role as shown in cells overexpressing Bcl-2 (Foyouzi-Youssefi et al., 2000). Bax is also been found to be able to bind to ER membrane resident Bcl-2 protein (Oakes et al., 2003). Other than Bax, Puma, Noxa and Bim also translocate to the mitochondrial membrane suggesting that they may play a role in sensitizing mitochondrial membrane to heat shock by interfering with the anti-apoptotic members of the same family as described with other stresses (Nickson et al., 2006; Li and Lee, 2006). Yet, whether heat shock-induced apoptosis is caused by the translocation of pro-apoptotic proteins to specific organelles or it is a matter of the duration of stress, is still unclear. However, our findings could contribute to the prognostic relevance of pro-apoptotic/anti-apoptotic onco-proteins ratio present in the ER and mitochondrial membranes, since in both organelles, this ratio is balanced in favour of pro-apoptotic Bcl-2 proteins in normal cells (Scheme1). Since induction of thermotolerance did not alter the balance between these two kinds of proteins, we believe that the way that thermotolerance might protect cells against toxicity of subsequent exposure to high temperature is by

maintaining a stable balance between the pro-and anti-apoptotic proteins, either by enhancing the presence of anti-apoptotic proteins in the ER and mitochondrial membranes or by limiting the translocation of the pro-apoptotic proteins to these two organelles.

These findings also suggested that the ER-mediated apoptosis might be the consequence of prolonged stress due to the accumulation of unfolded proteins in the ER since we did not see a disruption of calcium homeostasis before 30 minutes of thermal stress (data not shown). Meanwhile, in our previous study we showed that Bax translocates to mitochondria and causes cytochrome c release within 30 minutes at 43 and 45°C (Bettaieb and Averill-Bates, 2005). Nevertheless, there are also studies reporting an early release of cytochrome c from mitochondria by lethal heat shock (43°C) (Li et al., 2000) which confirm our findings and suggest that apoptosis induced by lethal heat shock is mainly mitochondrial-mediated cell death rather than ER-induced apoptosis.

The role of thermotolerance in the protective effect against cytotoxic effects of the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family has not been fully elucidated yet. However, several studies proposed an interesting mechanism of regulation of the function Bcl-2 proteins involving heat shock proteins in direct or indirect way (for review see Creagh et al., 2000). Some of these studies, for instance, have implicated the modulation of Bcl-2-dependent apoptosis by heat shock protein 70 (HSP 70) and it was reported that HSP 70 blocks heat-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria and thereby inhibiting the release of pro-apoptotic factors such as cytochrome c or AIF from mitochondria (Stankiewicz et al., 2005; Lachapelle et al., 2007). Similarly, stress-inducible HSP 70 is also reported to prevent the stimulation of Bid-induced mitochondrial pathway of apoptosis by inhibiting the cross-talk mechanism in response to TNF (Chauhan et al., 2003). HSP

70 can also prevent indirectly the activation of several pro-apoptotic Bcl-2 proteins by MAP kinases. For example, HSP 70 negatively regulates JNK activity by promoting either JNK dephosphorylation (Meriin et al., 1999) or suppressing its direct phosphorylation and activation by the upstream kinase SEK (Park et al., 2001). In contrast, phosphorylation activity of JNK is known to activate several members of Bcl-2 family and deactivate others. Direct phosphorylation and activation of Bim and Bmf that are normally sequestered by binding to dynein and myosin V motor complexes leads to Bax/Bak-dependent mitochondrial apoptosis (Lei and Davis; 2003). Further, JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 in response to DNA damage. Thus, the inhibition of JNK activity by HSP 70 may prevent the translocation of Bax to mitochondria (Tsuruta et al., 2004).

In addition to HSP 70, HSP 27 was also found to mediate the suppression of Bid translocation to the mitochondria (Paul et al., 2002). HSP 27 can also inhibit indirectly apoptosis by interacting and stabilizing pro-survival proteins such as Akt (Rane et al. 2001) which is known to inhibit multiple proteins of the apoptotic machinery, including Bad and caspase-9 (Biggs et al., 1998; Ozes et al., 1999).

The study of sensitivity of cells to heat shock and the effect of heat shock on calcium homeostasis are poorly understood. In some studies, which investigated the effect of heat shock on protein aggregation (Meriin et al., 1999), intracellular pH (pHi) and intracellular free calcium concentration $[(Ca^{2+})_i]$ (Drumon et al., 1996), it has been reported that heat shock induces changes in both pHi and $[(Ca^{2+})_i]$ in *Drosophila melanogaster* larval salivary gland cells. These changes according to the authors are “not sufficient, nor are required for a complete induction of the heat shock response”. Recently, heat shock was shown to induce MMP-1 expression on a calcium-dependent signaling process in human epidermal keratinocytes and that this process

requires activation of epidermal transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1). TRPV1 is a Ca^{2+} permeable non-selective cation channel activated by physical stresses and is known to play a role in apoptosis (Li et al., 2007). In contrast to these studies, others found that exposure to heat shock does not affect calcium homeostasis. For instance, exposure of bone marrow-derived mast cells to 1 hour of heat shock (43°C) inhibits calcium mobilization (Mortaz et al., 2005). Similarly, in vivo heat shock preconditioning was shown to mitigate calcium overload during ischemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart (Szenczi et al., 2004). In the same way Rahimi (2005) in his study on heat shock effect on broiler chicken showed that mild heat shock at early growth phase leads to the induction of thermotolerance without any change in plasma, glucose or calcium levels. Mild cranial hyperthermia (39°C) protected also against calpain-mediated spectrin degradation in the brains of rats subjected to 1 h of transient proximal middle cerebral artery (MCA) clip-occlusion (Morimoto et al., 1997).

Calpains are a family of cytosolic cysteine proteases, and their activation is preceded by increased levels of cytosolic calcium. It has been reported that increased cytosolic free calcium and calpain activation are early events in ER-induced apoptosis. It was also demonstrated that activation of mitochondrial pathway under certain conditions could occur upon calpain-mediated cleavage of Bid (Mandic et al., 2002) or Bap31-mediated cleavage of pro-caspase 8 (Breckenridge et al., 2007). In our previous study we showed that the use of Fas antagonist (Kp7-6) prevented caspase-8 activation by heat shock and also inhibited the cleavage of Bid by caspase-8 (Bettaieb and Averill-Bates, 2007). Both events might occur during ER stress-mediated apoptosis. Here we conclude that in heat shock-induced apoptosis, these events occur independently of ER stress and arise only upon stimulation of Fas receptor. Thus, induction of mitochondrial pathway of apoptosis by heat shock observed previously (Bettaieb and Averill-Bates, 2005) does not require ER stress,

which confirms the previous result of Bcl-2 proteins mobilization and release of cytochrome c, described earlier. However, induction of ER stress as a response to accumulation of unfolded proteins in the ER might be a cellular strategy to enhance apoptosis and avoid necrotic cell death.

Conclusion:

This is the first report to show the involvement of ER stress, specifically seen as caspase-12 activation and up-regulation of Grp78, in heat shock-induced apoptosis. We also present evidence for calpain-dependent activation of caspase-12 and caspase-7. In accordance with calpain-mediated activation of caspase-12, both BAPTA/AM and calpain inhibitor were able to block heat shock-induced activation of both ER resident caspases (4 and 12) in HeLa cells. In contrast, they partially inhibited caspase-3 activation and DNA fragmentation. Exposure of cells to mild hyperthermia did not protect HeLa cells against protein aggregation and ER stress, since both CHOP and GRP78/Bip (data not shown) increased in both thermotolerant and non thermotolerant cells. However, thermotolerance diminished the disruption of calcium homeostasis, the activation of caspases-4 and -12 as well as calpain cleavage and activation. In summary, in the present study we demonstrated a novel mechanism of action for heat shock. We show that severe heat shock is able to induce apoptosis independently of ER stress-mediated apoptosis, since mitochondrial injuries occur before ER stress and the inhibition of ER stress does not protect against apoptosis.

Further, we show how interesting is the correlation between the induction of thermotolerance and the increase of expression of heat shock proteins, which are known to protect against several stresses including heavy metals, radiations and oxidative stress. Potentially, the most important outcome of this correlation is that the use of hyperthermia as an alternative leads to a re-evaluation to classic methods used

in cancer therapy and possibly to new, improved treatment strategies to overcome cancer treatment and mostly important, protect the surrounding tissues against side effects of classic treatment.

Références

- Arai, Y., T. Kondo, et al. (2002). "Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells." J Biol Chem **277**(21): 18986-93.
- Bao, Q. and Y. Shi (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death Differ **14**(1): 56-65.
- Baronzio, G., A. Gramaglia, et al. (2006). "Hyperthermia and immunity. A brief overview." In Vivo **20**(6A): 689-95.
- Bassik, M. C., L. Scorrano, et al. (2004). "Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis." Embo J **23**(5): 1207-16.
- Bates, J. H., E. Przybytkowski, et al. (1986). "A model-free way of representing hyperthermia cell survival data." Radiat Res **107**(3): 307-16.
- Bettaieb, A. and D. A. Averill-Bates (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol **205**(1): 47-57.
- Bevers, E. M., P. Comfurius, et al. (1999). "Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1439**(3): 317-30.
- Biggs, J. R., N. G. Ahn, et al. (1998). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in U937 leukemic cells induces phosphorylation of the amino terminus of the TATA-binding protein." Cell Growth Differ **9**(8):

667-76.

- Bouhon, I. A., M. Shinkai, et al. (1999). "Synergism between mild hyperthermia and interferon-beta gene expression." Cancer Lett **139**(2): 153-8.
- Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, et al. (2003). "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol." J Cell Biol **160**(7): 1115-27.
- Creagh, E. M., D. Sheehan, et al. (2000). "Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells." Leukemia **14**(7): 1161-73.
- Cribb, A. E., M. Peyrou, et al. (2005). "The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity." Drug Metab Rev **37**(3): 405-42.
- Edwards, M. J. (1998). "Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links?" Cell Stress Chaperones **3**(4): 213-20.
- Everts, M. (2007). "Thermal scalpel to target cancer." Expert Rev Med Devices **4**(2): 131-6.
- Fajardo, L. F. (1984). "Pathological effects of hyperthermia in normal tissues." Cancer Res **44**(10 Suppl): 4826s-4835s.
- Foufelle, F. and P. Ferre (2007). "[Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]." Med Sci (Paris) **23**(3): 291-6.
- Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, et al. (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺

concentration within the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5723-8.

Germain, M., J. P. Mathai, et al. (2002). "BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria." J Biol Chem **277**(20): 18053-60.

Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, et al. (2002). "Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members." J Biol Chem **277**(30): 27217-26.

Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, et al. (2002). "Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members." J Biol Chem **277**(30): 27217-26.

Giulivi, C. (2007). "Mitochondria as generators and targets of nitric oxide." Novartis Found Symp **287**: 92-100; discussion 100-4.

Gradzka, I. (2006). "[Mechanisms and regulation of the programmed cell death]." Postepy Biochem **52**(2): 157-65.

Gustafsson, A. J. and M. S. Islam (2005). "[Cellular calcium ion signalling--from basic research to benefits for patients]." Lakartidningen **102**(44): 3214-9.

Hanna, R. A., B. E. Garcia-Diaz, et al. (2007). "Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants." FEBS Lett **581**(16): 2894-8.

Helewski, K. J., G. I. Kowalczyk-Ziomek, et al. (2006). "[Apoptosis and necrosis--two different ways leading to the same target]." Wiad Lek **59**(9-10): 679-

84.

Hetz, C. A. and C. Soto (2006). "Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders." Curr Mol Med **6**(1): 37-43.

Hildebrandt, B., P. Wust, et al. (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Crit Rev Oncol Hematol **43**(1): 33-56.

Issels, R. D., M. Schlemmer, et al. (2006). "The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma." Curr Oncol Rep **8**(4): 305-9.

Jakubczak, B., M. Wasik, et al. (2006). "Kinetics of calcium ion concentration accompanying signal transduction in neutrophils from children with increased susceptibility to infections." J Physiol Pharmacol **57 Suppl 4**: 131-7.

Khan, V. R. and I. R. Brown (2002). "The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat." Cell Stress Chaperones **7**(1): 73-90.

Ko, S., W. F. Yuen, et al. (2000). "Reversal of TNF-alpha resistance by hyperthermia: role of mitochondria." Life Sci **67**(25): 3113-21.

Lachapelle, G., S. M. Radicioni, et al. (2007). "Acute acidification or amiloride treatment suppresses the ability of Hsp70 to inhibit heat-induced apoptosis." Apoptosis **12**(8): 1479-88.

- Lamkanfi, M., M. Kalai, et al. (2004). "Caspase-12: an overview." Cell Death Differ **11**(4): 365-8.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2432-7.
- Li, J., B. Lee, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53." J Biol Chem **281**(11): 7260-70.
- Li, J. H., J. Donovan, et al. (1999). "Inhibition of protein kinase C activity promotes heat-induced apoptosis in RIF-1 but not in TR-4 cells." Int J Radiat Biol **75**(7): 903-11.
- Li, W. H., Y. M. Lee, et al. (2007). "Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Mediates Heat-Shock-Induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Epidermal Keratinocytes." J Invest Dermatol.
- MacLennan, D. H. and S. R. Chen (1993). "The role of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in malignant hyperthermia." Ann N Y Acad Sci **707**: 294-304.
- Mancini, M., B. O. Anderson, et al. (1997). "Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line." J Cell Biol **138**(2): 449-69.

- Mandic, A., K. Viktorsson, et al. (2002). "Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis." Mol Cell Biol **22**(9): 3003-13.
- Mathai, J. P., M. Germain, et al. (2005). "BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death." J Biol Chem **280**(25): 23829-36.
- McKee, A. E. and C. J. Thiele (2006). "Targeting caspase 8 to reduce the formation of metastases in neuroblastoma." Expert Opin Ther Targets **10**(5): 703-8.
- Meriin, A. B., J. A. Yaglom, et al. (1999). "Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72." Mol Cell Biol **19**(4): 2547-55.
- Morimoto, T., M. D. Ginsberg, et al. (1997). "Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia." Brain Res **746**(1-2): 43-51.
- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2004). "Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis." J Biol Chem **279**(48): 50375-81.
- Mortaz, E., F. A. Redegeld, et al. (2005). "Mast cell activation is differentially affected by heat shock." Exp Hematol **33**(8): 944-52.
- Moulin, M. and A. P. Arrigo (2008). "Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis." Cell Stress Chaperones.

- Nickson, P., A. Toth, et al. (2007). "PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Cardiovasc Res **73**(1): 48-56.
- Oakes, S. A., J. T. Opferman, et al. (2003). "Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members." Biochem Pharmacol **66**(8): 1335-40.
- O'Connor, R. (1998). "Survival factors and apoptosis." Adv Biochem Eng Biotechnol **62**: 137-66.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-65.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, et al. (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." Nature **401**(6748): 82-5.
- Park, H. S., J. S. Lee, et al. (2001). "Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase." Embo J **20**(3): 446-56.
- Paschen, W. (2004). "Endoplasmic reticulum dysfunction in brain pathology: critical role of protein synthesis." Curr Neurovasc Res **1**(2): 173-81.
- Paul, C., F. Manero, et al. (2002). "Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release." Mol Cell Biol **22**(3): 816-34.
- Pinton, P. and R. Rizzuto (2006). "Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic

reticulum." Cell Death Differ **13**(8): 1409-18.

Porn-Ares, M. I., A. Samali, et al. (1998). "Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis." Cell Death Differ **5**(12): 1028-33.

Przybytkowski, E., J. H. Bates, et al. (1986). "Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins." Radiat Res **107**(3): 317-31.

Rane, M. J., P. Y. Coxon, et al. (2001). "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils." J Biol Chem **276**(5): 3517-23.

Roti Roti, J. L. (2007). "Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication." Int J Hyperthermia **23**(1): 3-15.

Roti Roti, J. L. (2008). "Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events." Int J Hyperthermia **24**(1): 3-15.

Rudner, J., A. Lepple-Wienhues, et al. (2001). "Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4161-72.

Sato, N., F. Urano, et al. (2000). "Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independent of presenilin expression." Nat Cell Biol **2**(12): 863-70.

- Schuler, M. and D. R. Green (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." Biochem Soc Trans **29**(Pt 6): 684-8.
- Shellman, Y. G., W. R. Howe, et al. (2008). "Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells." J Invest Dermatol **128**(4): 949-56.
- Shimizu, Y. and L. M. Hendershot (2007). "Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum." Adv Exp Med Biol **594**: 37-46.
- Shroff, E. H., C. Snyder, et al. (2007). "BCL-2 Family Members Regulate Anoxia-Induced Cell Death." Antioxid Redox Signal.
- Souslova, T. and D. A. Averill-Bates (2004). "Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide." Int J Radiat Oncol Biol Phys **60**(5): 1538-51.
- Stankiewicz, A. R., G. Lachapelle, et al. (2005). "Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation." J Biol Chem **280**(46): 38729-39.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1997). "Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8." J Biol Chem **272**(41): 25719-23.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-5.
- Szenczi, O., P. Kemecsei, et al. (2005). "In vivo heat shock preconditioning mitigates

calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart." Pflugers Arch **449**(6): 518-25.

Tsuruta, F., J. Sunayama, et al. (2004). "JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins." Embo J **23**(8): 1889-99.

Turcotte, S. and D. A. Averill-Bates (2001). "Sensitization to the cytotoxicity of melphalan by ethacrynic acid and hyperthermia in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells." Radiat Res **156**(3): 272-82.

Urade, R. (2007). "Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants." Febs J **274**(5): 1152-71.

van Bree, C., J. J. Krooshoop, et al. (1996). "Hyperthermia enhances tumor uptake and antitumor efficacy of thermostable liposomal daunorubicin in a rat solid tumor." Cancer Res **56**(3): 563-8.

van der Zee, J. (2002). "Heating the patient: a promising approach?" Ann Oncol **13**(8): 1173-84.

VanSlyke, J. K. and L. S. Musil (2002). "Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress." J Cell Biol **157**(3): 381-94.

Vertrees, R. A., G. C. Das, et al. (2005). "A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells." Mol Carcinog **44**(2): 111-21.

- Vindis, C., M. Elbaz, et al. (2005). "Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): 639-45.
- Wang, X. Z., B. Lawson, et al. (1996). "Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)." Mol Cell Biol **16**(8): 4273-80.
- Yamasaki, S., N. Yagishita, et al. (2007). "The roles of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway." Cell Cycle **6**(11): 1319-23.
- Yanase, M., M. Shinkai, et al. (1998). "Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes." Jpn J Cancer Res **89**(7): 775-82.
- Yuen, W. F., K. P. Fung, et al. (2000). "Hyperthermia and tumour necrosis factor- α induced apoptosis via mitochondrial damage." Life Sci **67**(6): 725-32.
- Zaidi, A. K., M. S. Patil, et al. (2001). "Effect of whole body hyperthermia on radiation therapy of transplanted fibrosarcoma in Swiss mice." Int J Hyperthermia **17**(5): 428-38.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2006). "The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease." Neurology **66**(2 Suppl 1): S102-9.

Figure legends

Figure 1: Hyperthermia induces expression of CHOP. Non-thermotolerant and thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Total cellular expression (A,B) and nuclear levels of CHOP (31kDa) (C,D) were determined by Western blot. Protein levels are expressed relative to untreated controls at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), for HS versus 37°C. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) for thermotolerant versus non thermotolerant cells at each temperature.

Figure 2: Heat shock induces intracellular relocation of Bcl-2 family proteins. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Protein expression of Bcl-2 (26kDa), Bcl-xL (30kDa), Bax (21kDa), Bak (30kDa), Bik (20kDa), Bim-S (19kDa), Bim-L (), BimEL (), Puma (24kDa) and Noxa (16kDa) in whole cell lysates (A), cytosolic (B), mitochondrial (C) and ER rich (D) fractions is given relative to controls at 37°C (100%). Purity of subcellular fractions was verified using antibodies against lamin A, cytochrome oxidase (Cox2), GST π_1 , and calnexin, for nuclear (89%), mitochondrial (97%), cytoplasmic (98%) and microsomal fractions (92%), respectively. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1. PC represents whole cell lysate as positive control (C,D).

Figure 3. Disruption of calcium homeostasis by hyperthermia. Non-thermotolerant (A) and thermotolerant (B) cells were exposed to HS (3h, 42-45°C) and then labelled with Fluo-3AM for 45min. Cells (10,000) were analysed by flow cytometry (FL1). Fluo-3 fluorescence is shown relative to the control at 37°C (100%)

(C). Calcium ionophore A23187 (Iono.) was used as positive control. Data (C) represent means \pm SEM of at least three independent experiments: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), for HS versus 37°C. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) for thermotolerant versus non thermotolerant cells at each temperature.

Figure 4. Heat shock causes calpastatin cleavage. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Total protein expression of calpastatin (126kDa) (A,B) and its cleavage products (110kDa, 92kDa) (A,C,D) is given relative to the control at 37°C (100%). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 5. Heat shock induces cleavage of calpain and translocation to the ER rich fraction. Non-thermotolerant and thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Representative blots are shown for protein levels of native (110kDa) and cleaved (86kDa) calpain in whole cell lysates (A) and ER-rich fractions (C). Protein expression of calpain (B) and cleaved calpain (86kDa) in cell extracts (C) and ER rich fractions (E) is given relative to controls at 37°C (100%). Calpain enzymatic activity (F) is shown in cells, with or without pre-treatment for 2h with 100 μ M of BAPTA, BAPTA-AM, or calpain inhibitor (10 μ M). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 6. Hyperthermia induces vinculin cleavage. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Total protein expression (A,B) of vinculin (110kDa) and its (A,C) cleavage fragment (90kDa) is given relative

to the control at 37°C (100%). Where indicated, cells were pretreated for 2h with calpain inhibitor (10 μ M). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 7. Loss of mitochondrial membrane potential (MMP) during heat shock. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Where appropriate, cells were pre-treated for 2h with 100 μ M of BAPTA or BAPTA-AM. JC-1 fluorescence for 10,000 cells is given relative to the control at 37°C. FCCP was used as positive control. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 8: Role of calcium in the activation of caspase-12 and caspase-4 by hyperthermia. Thermotolerant and non-thermotolerant cells, with or without BAPTA, BAPTA-AM, or inhibitors of caspase 7 or calpain, were exposed to HS (3h, 42-45°C). Representative blots (A, C) are shown for protein levels of (A) pro-caspase 12 (55kDa), and cleavage fragments for caspase 12 (17kDa) and (C) caspase 4 (20kDa). Expression of caspase-12 (B) and caspase-4 (D) are given relative to controls at 37°C (1.0). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 9: Activation of caspases-4, -7 and -12 by hyperthermia. Thermotolerant and non-thermotolerant cells, with or without inhibitors of caspase 4 (20 μ M), caspase 7 (50 μ M) or caspase 12 (10 μ M), were exposed to HS (3h, 42-45°C). Caspase-12 (A), caspase-4(B) and caspase-7 (C) activities are given relative to controls at 37°C (1.0). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 10: ASK-1 and Traf-2 are not required for activation of caspase 4 and caspase 12. Thermotolerant and non-thermotolerant cells were exposed to HS (3h, 42-45°C). Representative blots are shown for protein levels of ASK-1 (155kDa) and Traf-2 (55kDa) in cytosolic (ASK-1: A-B; Traf-2: E-F) and ER-rich (ASK-1: C-D; Traf-2: G-H) fractions. Levels of proteins are relative to controls at 37°C (100%). (I) Cells were subjected to immunoprecipitation using anti-IRE-1 antibody. ASK-1, procaspase-12 and Traf-2 were detected by Western blot. PC and NC represent positive (whole cell lysate) and negative controls (agarose beads), respectively. Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 11: Calcium does not mediate activation of caspase 3 by hyperthermia. Thermotolerant and non-thermotolerant cells, with or without BAPTA (100 μ M), BAPTA-AM (100 μ M), or calpain inhibitor (10 μ M), were exposed to HS (3h, 42-45°C). Caspase-3 activity is given relative to the control at 37°C (1.0). Data represent means \pm SEM of at least three independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Figure 12: Heat shock induces chromatin condensation which is mediated by calcium, caspase 4 and caspase 12. Thermotolerant (B) and non-thermotolerant (A) cells, alone or with (C) BAPTA, (D) BAPTA-AM, or inhibitors of (E) caspase-4, (F) caspase-12, or (E) calpain, were exposed to HS (3h, 42-45°C). Cells were stained with Hoechst and PI. Magnification: 320X. Fractions of apoptotic (H) and necrotic (I) cells are shown relative to total cells. Data represent means \pm SEM of at least three

independent experiments. For definition of symbols for statistics, see legend to Figure 1.

Scheme 1: Heat shock alters the proapoptosis-antiapoptosis balance in Bcl-2 family proteins. (1) Heat shock caused a decrease in levels of proapoptosis proteins Bax, Bak, Bim, Bik, Puma and Noxa in the cytosol. Heat induced translocation of (2) Bax, Bak, Bik, Bim, Puma and Noxa to mitochondria, and (3) Bax, Bak, Bik and Bim to the ER rich fraction. (4) Heat shock caused a decrease in levels of antiapoptosis proteins Bcl-2 and Bcl-xL in both ER and mitochondria. (5) Activation of death receptors by heat leads to increased levels of proapoptosis protein tBid at mitochondria (Bettaieb & Averill-Bates, 2009). (6) Heat causes an increase in propapoptosis proteins at mitochondria, (7) leading to cytochrome c release, (8) caspase activation, (9) nuclear chromatin condensation and (10) apoptosis. (11) The increase in proapoptosis proteins at the ER resulted in caspase-12 activation and apoptosis.

Figure 1: Heat shock induces the expression of CHOP

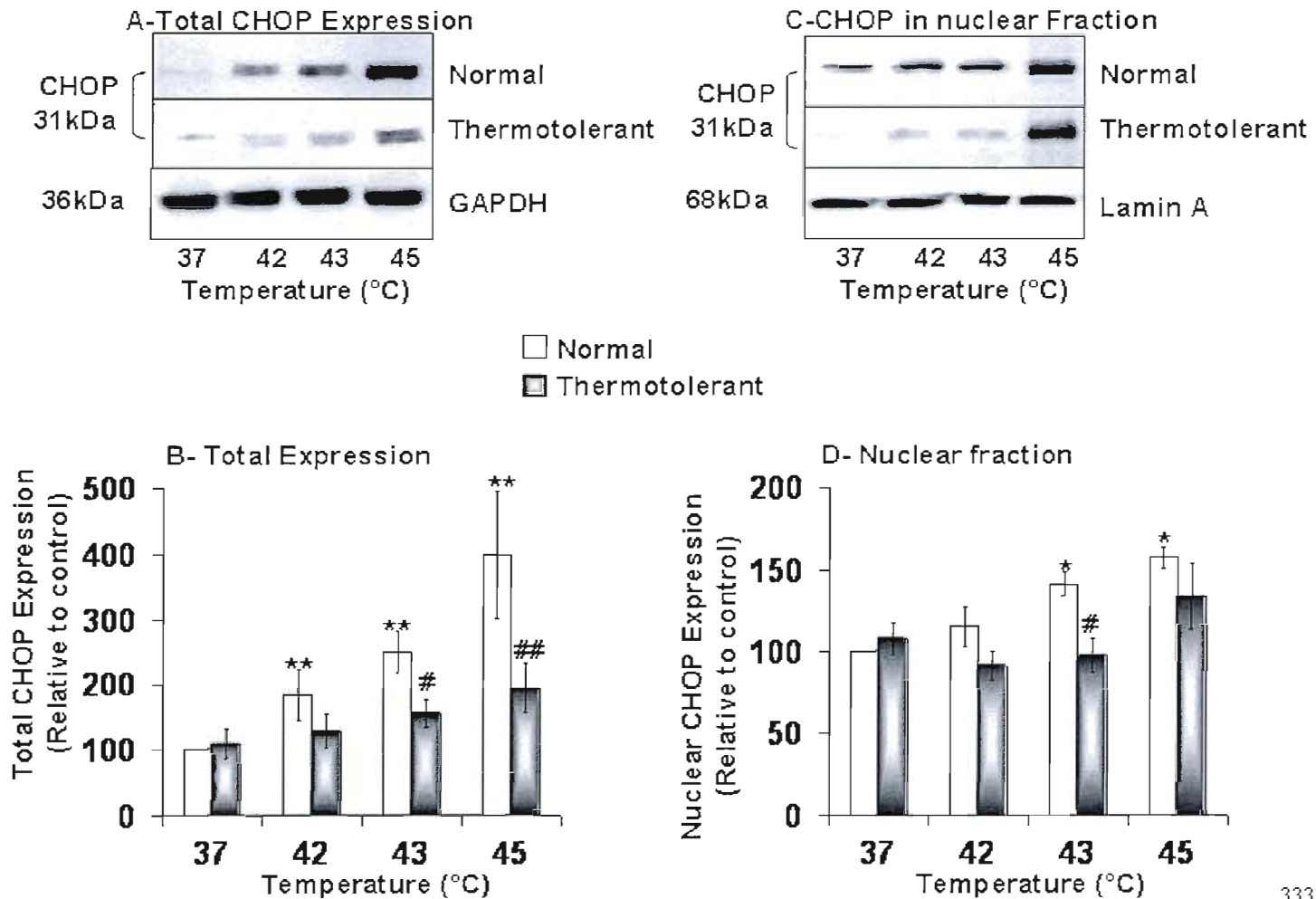


Figure 1A-D

Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins

A- Protein Expression in whole cell lysates:

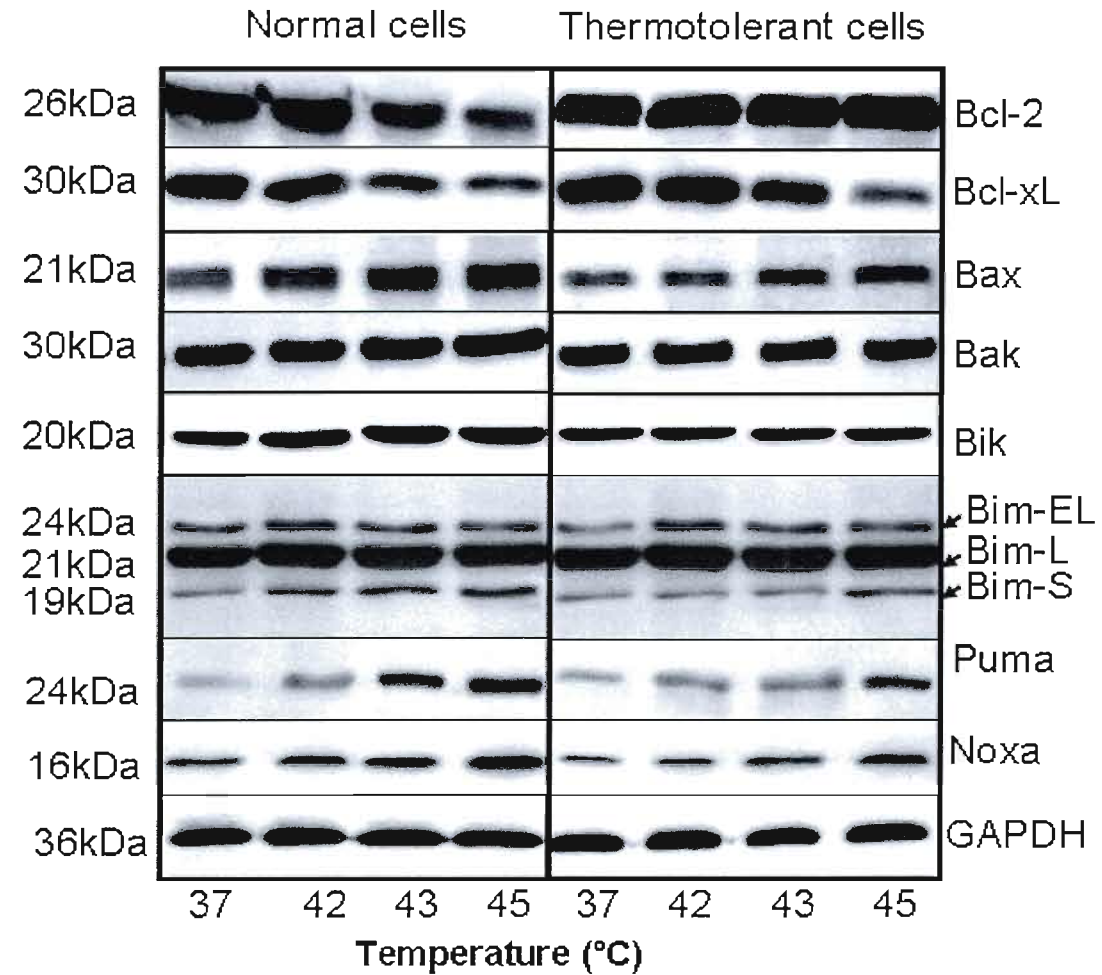


Figure 2A

Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins

B- Protein Expression in cytosolic fraction:

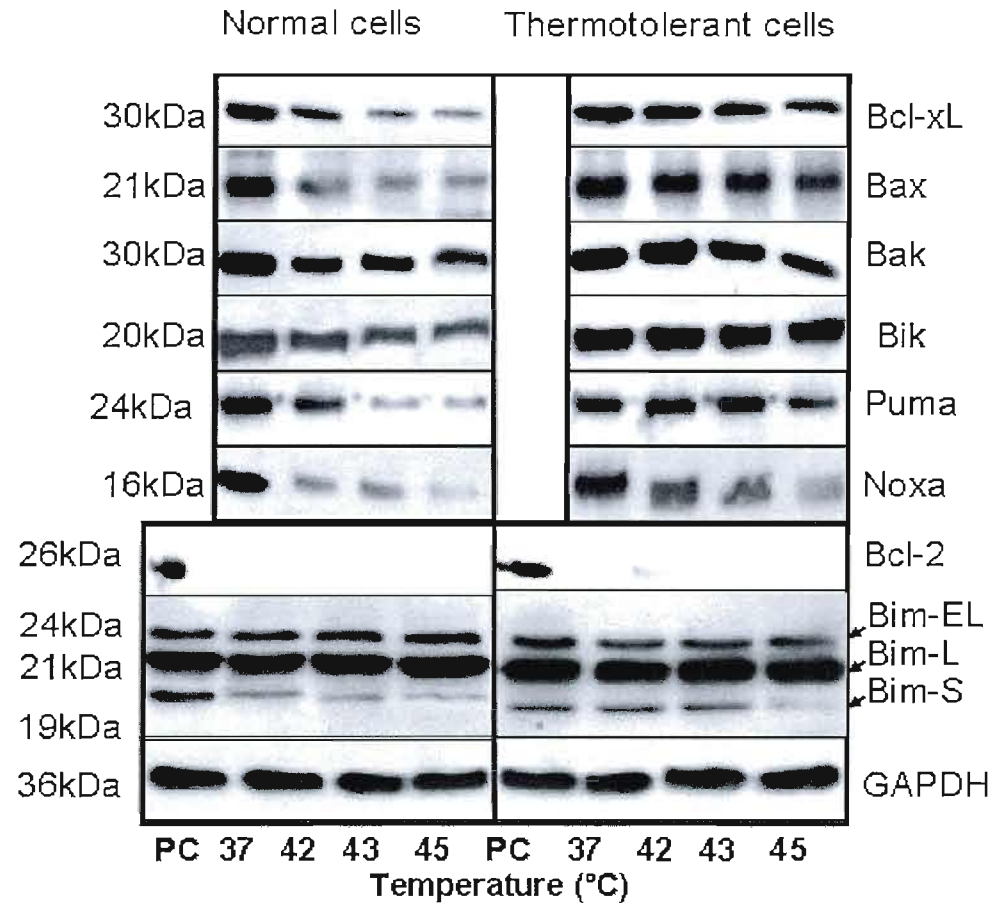


Figure 2B

Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins

C- Protein Expression in mitochondrial fraction:

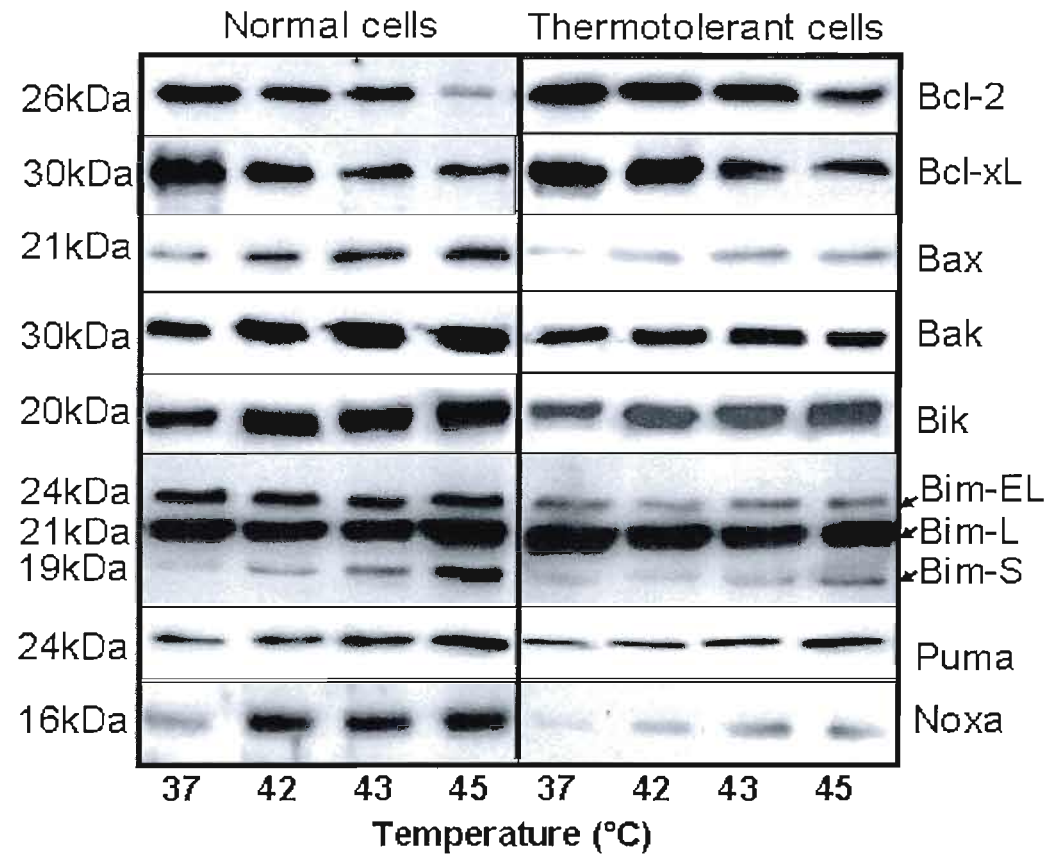


Figure 2C

Figure 2: Heat shock induces relocalization of Bcl-2 family proteins

D- Protein Expression in ER rich fraction:

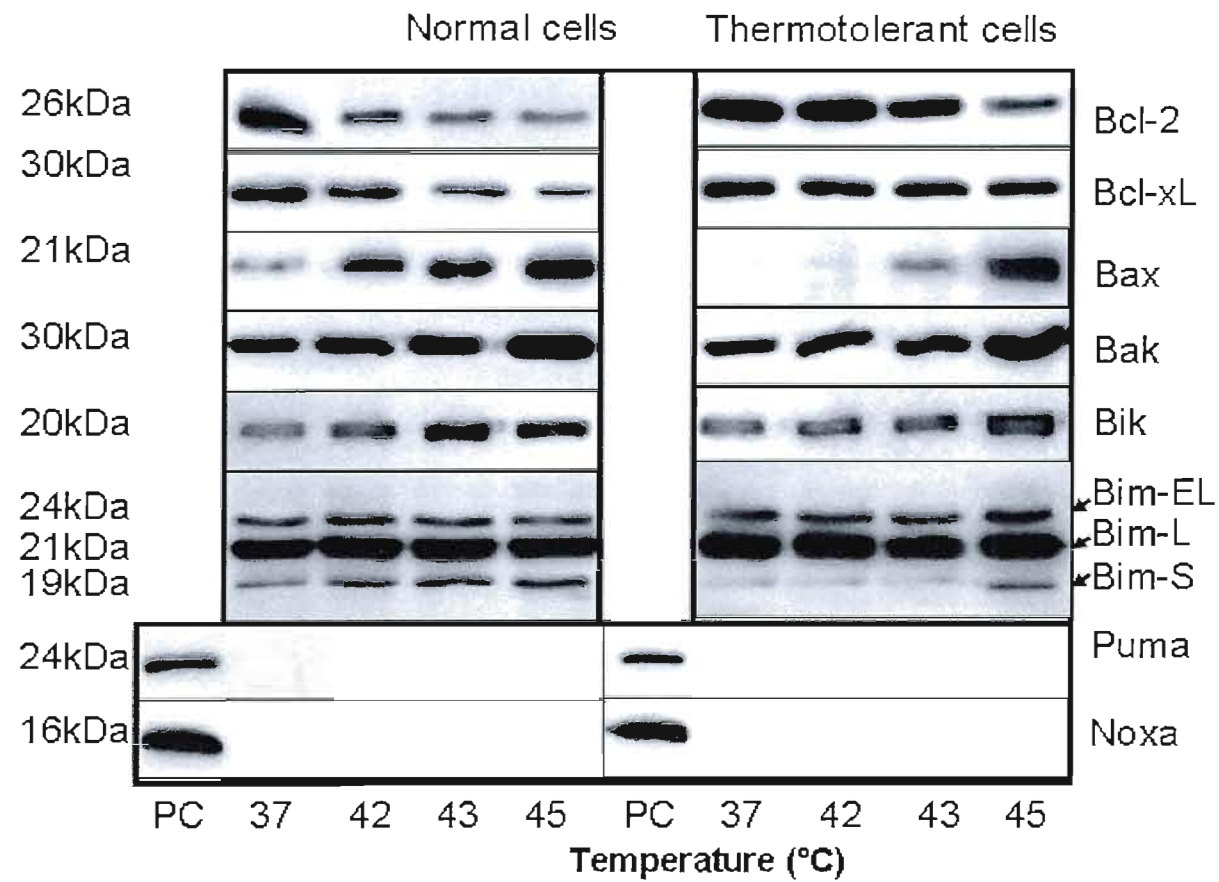
**Figure 2D**

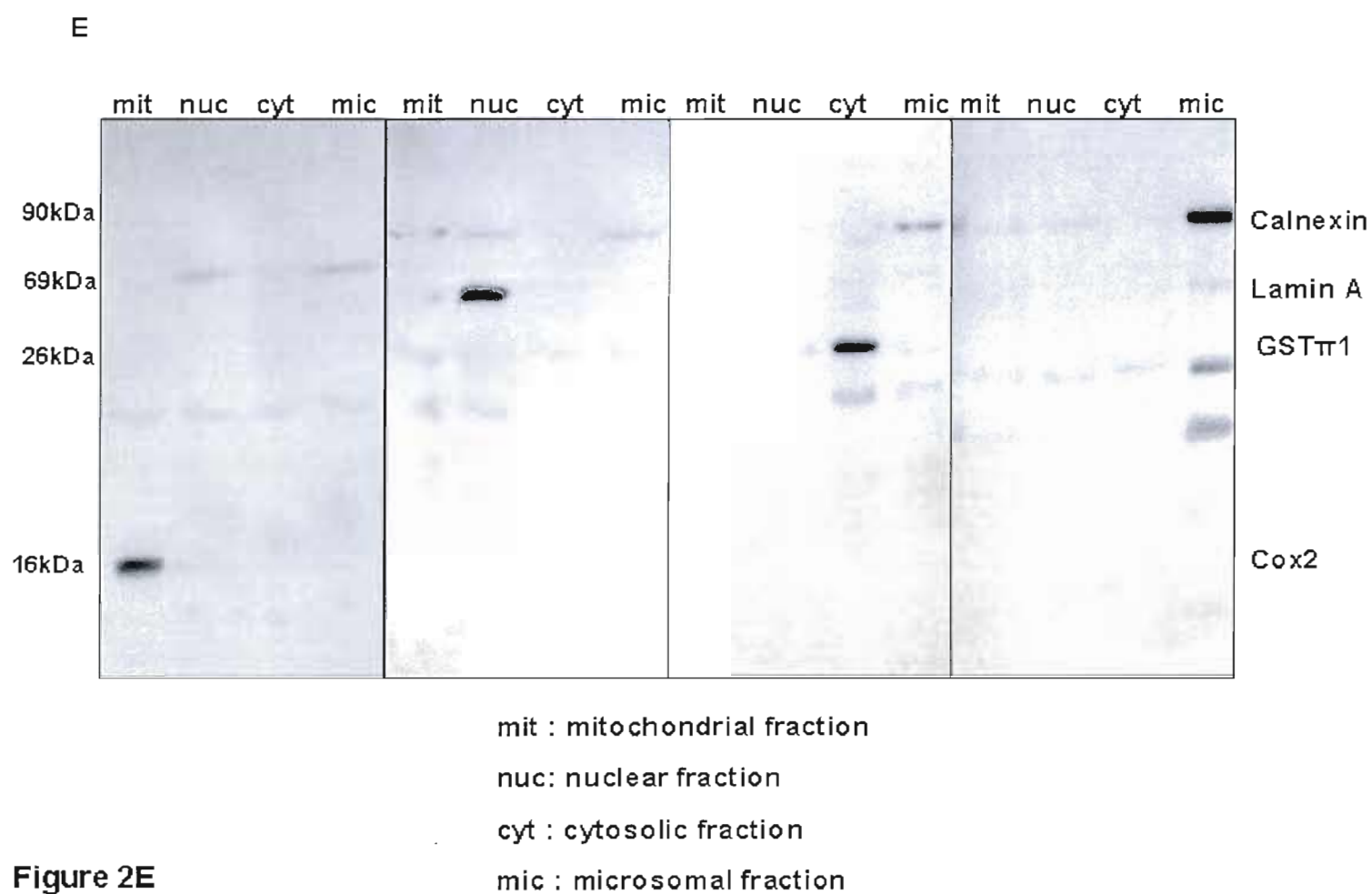
Figure 2: Purity of fractionation**Figure 2E**

Figure 2: Bcl-2 Protein Expression

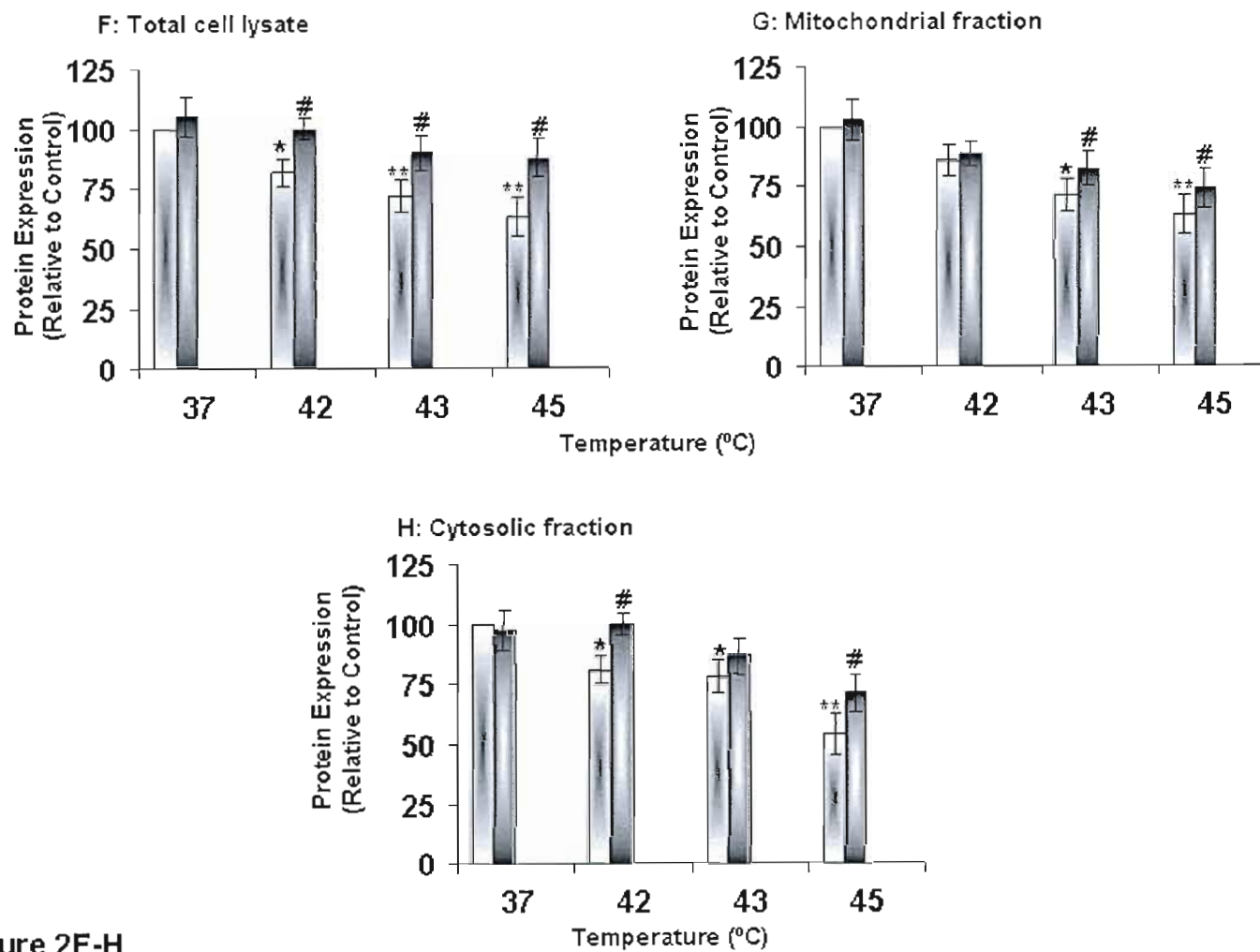


Figure 2F-H

Figure 2: BcL-xL Protein Expression

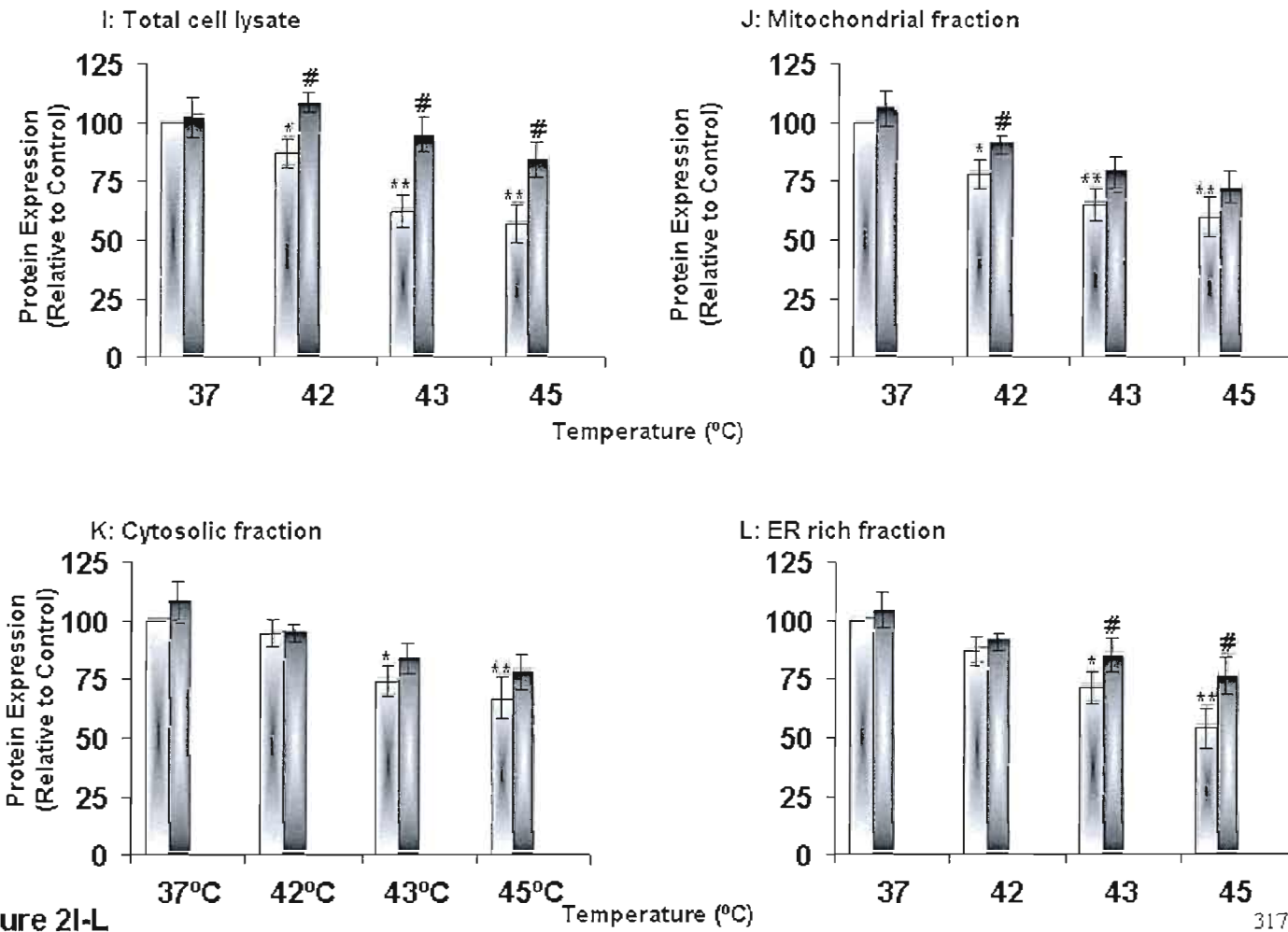


Figure 2: Bax Protein Expression

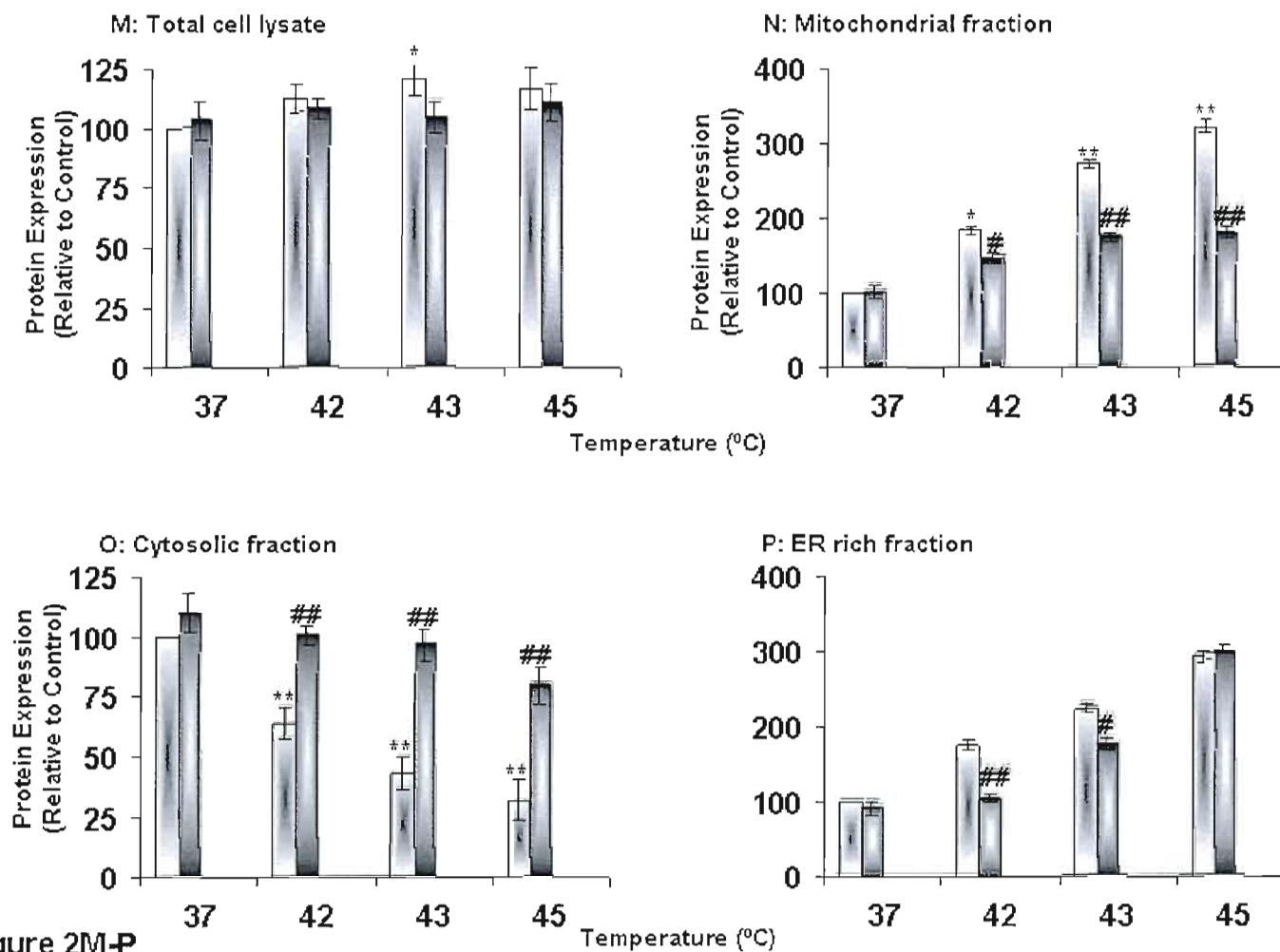


Figure 2M-P

Figure 2: Bak Protein Expression

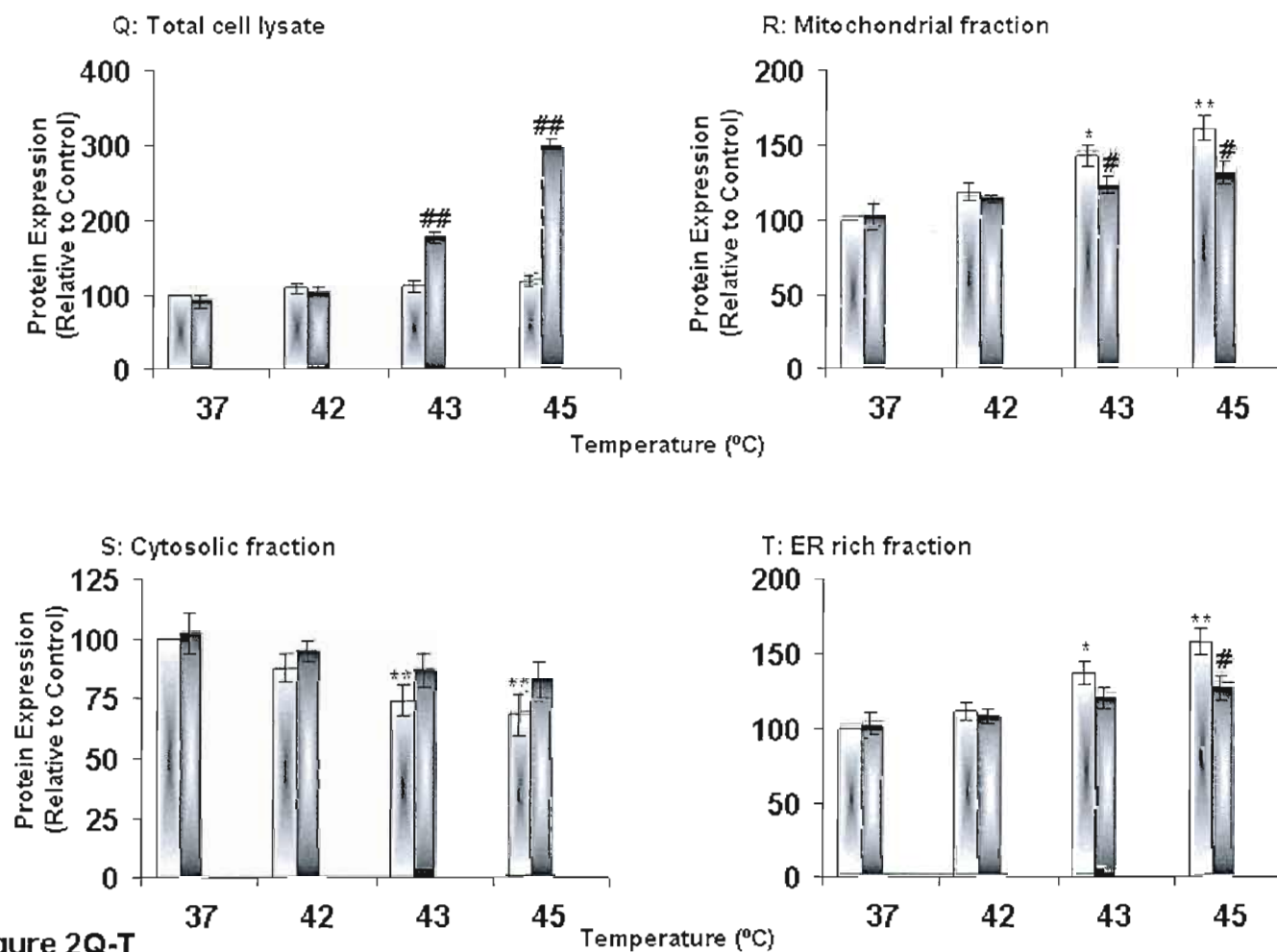


Figure 2: Bik Protein Expression

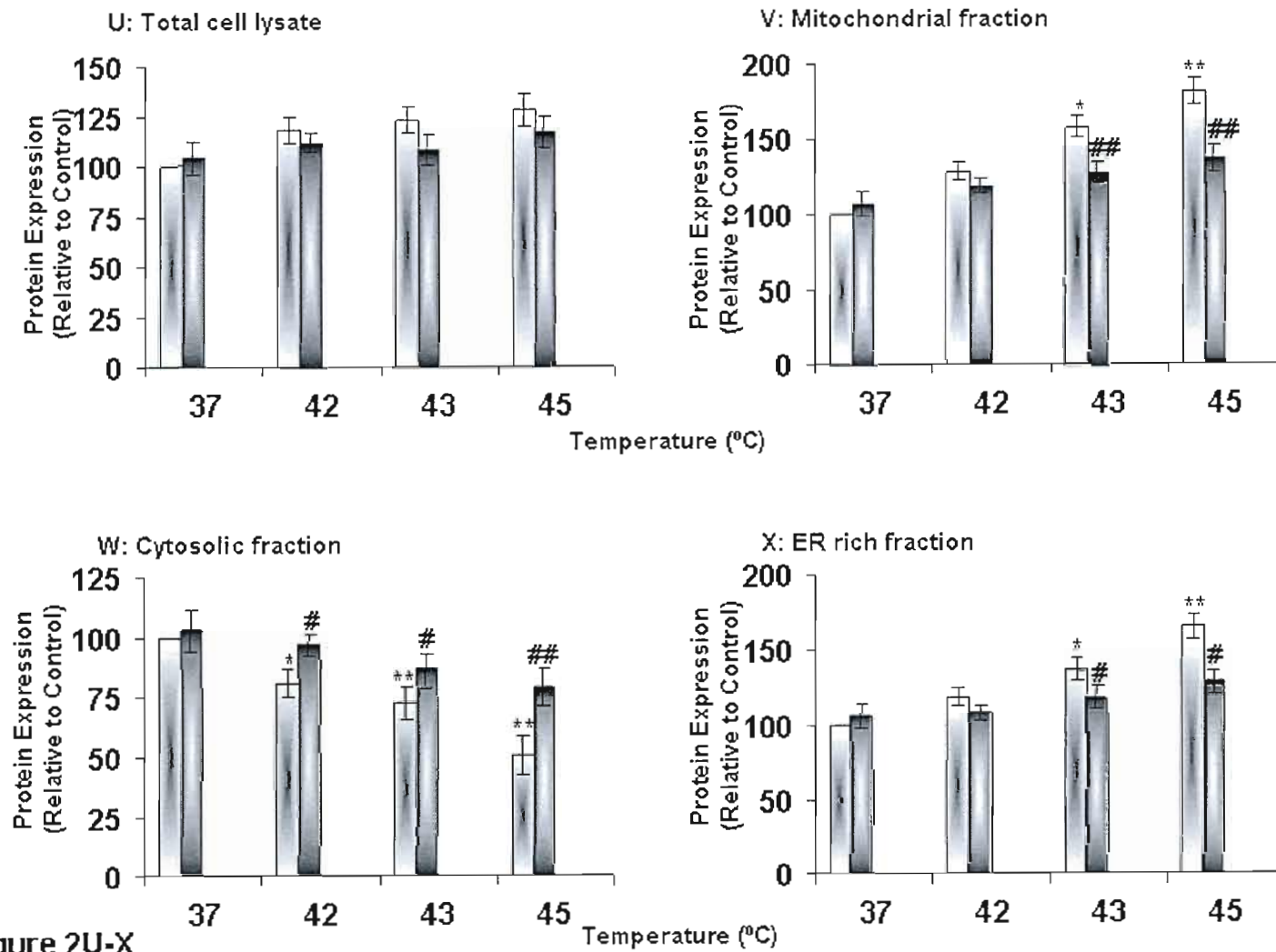


Figure 2: Bim Protein Expression

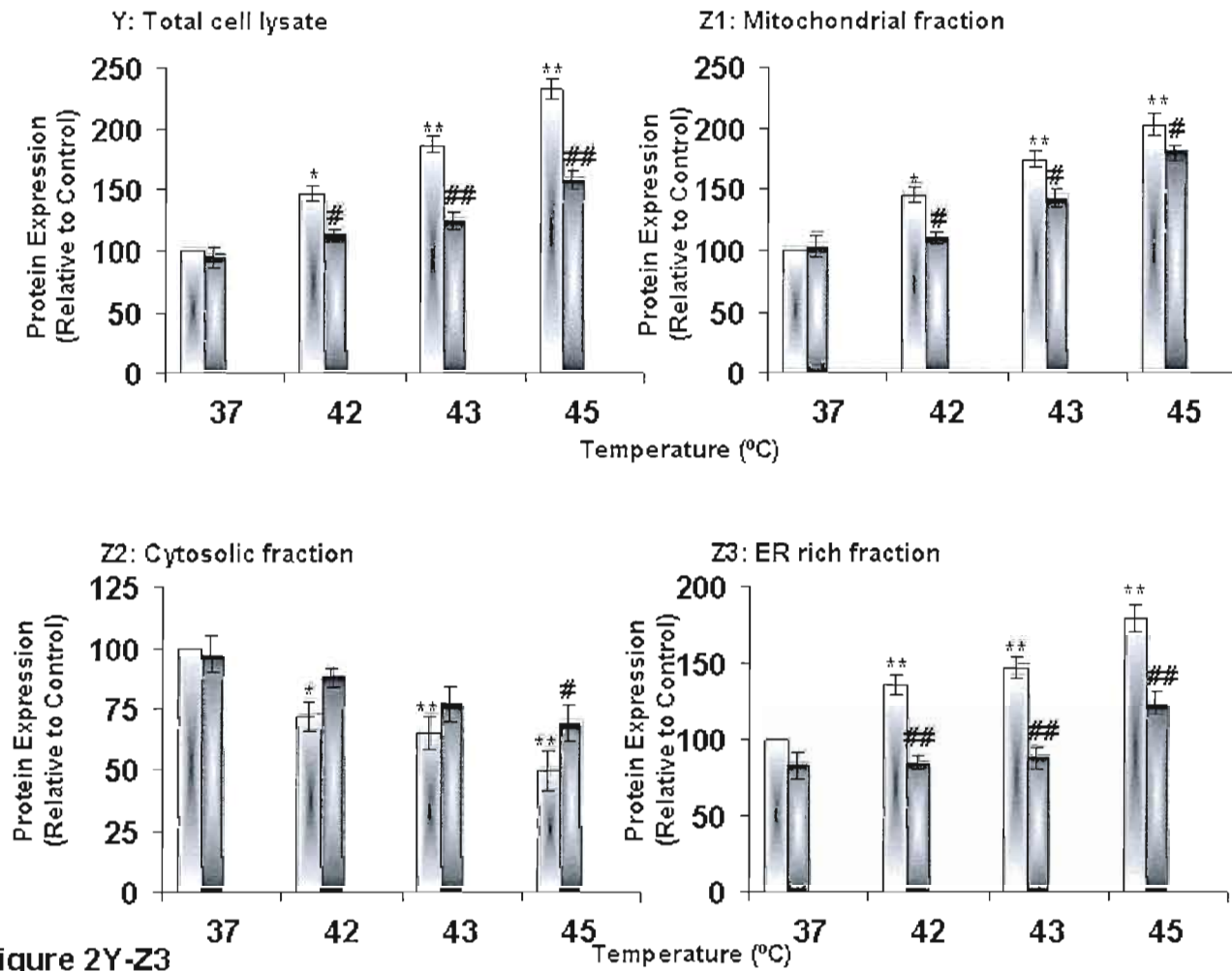


Figure 2: Puma Protein Expression

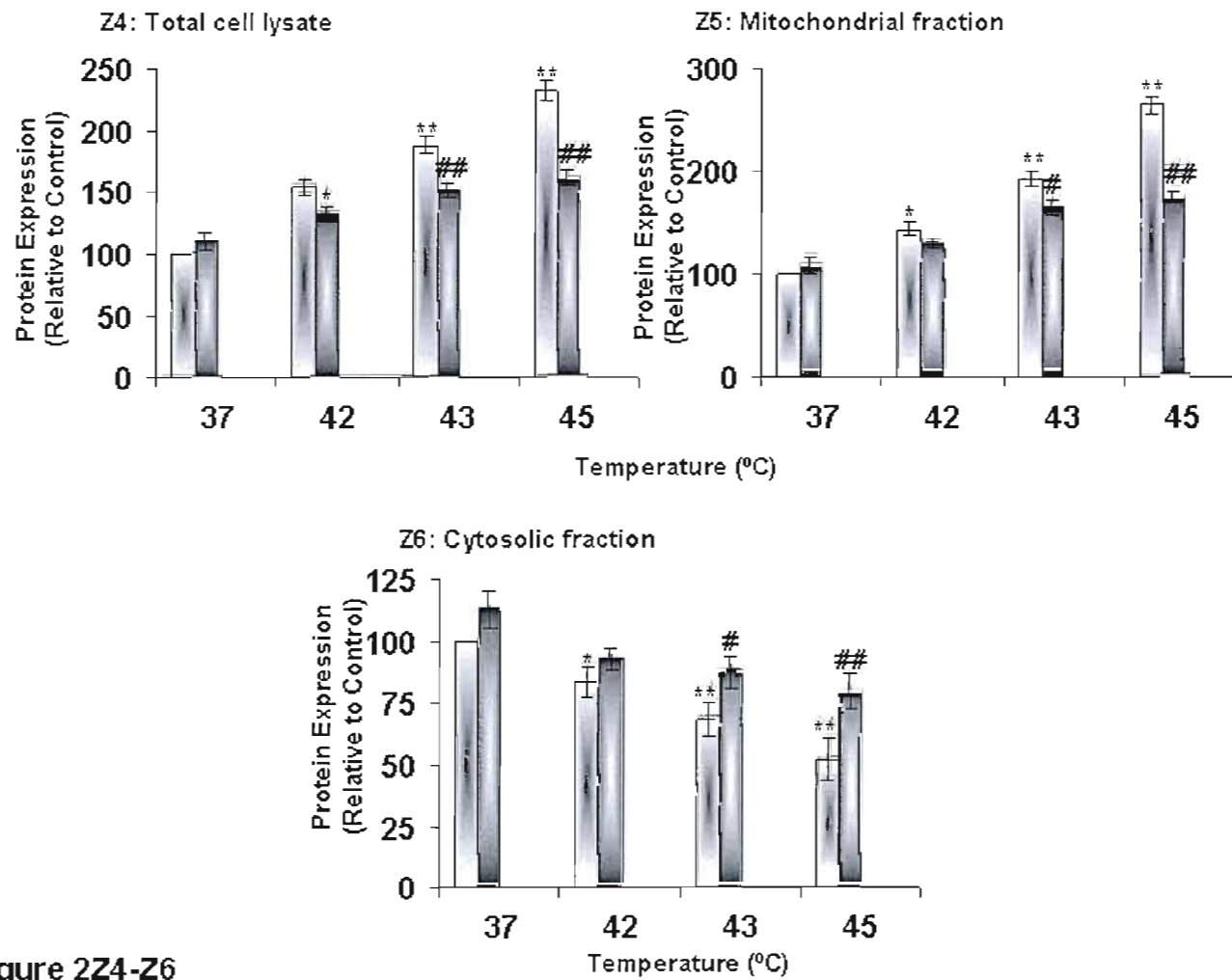


Figure 224-Z6

Figure 2: Noxa Protein Expression

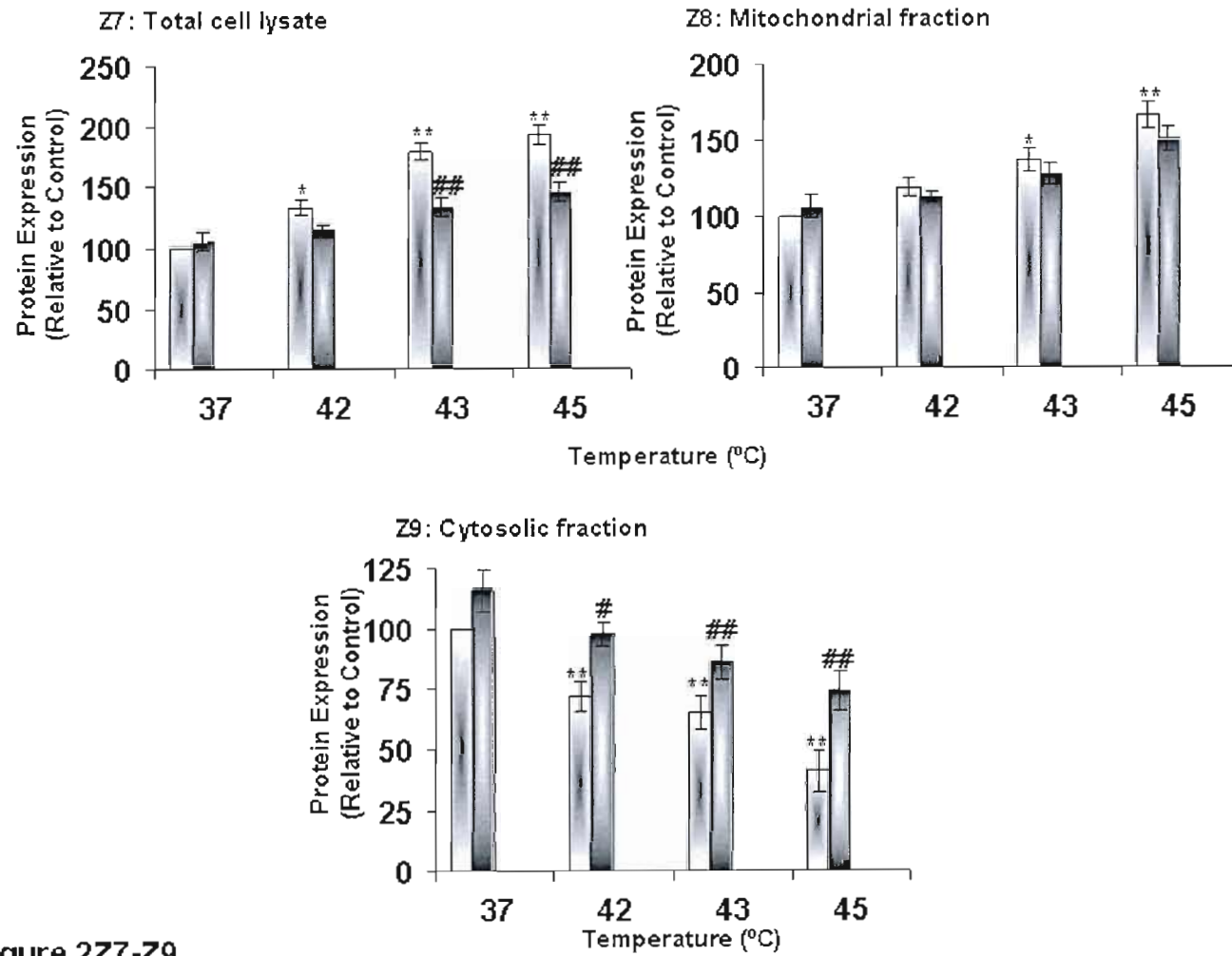


Figure 2Z7-Z9

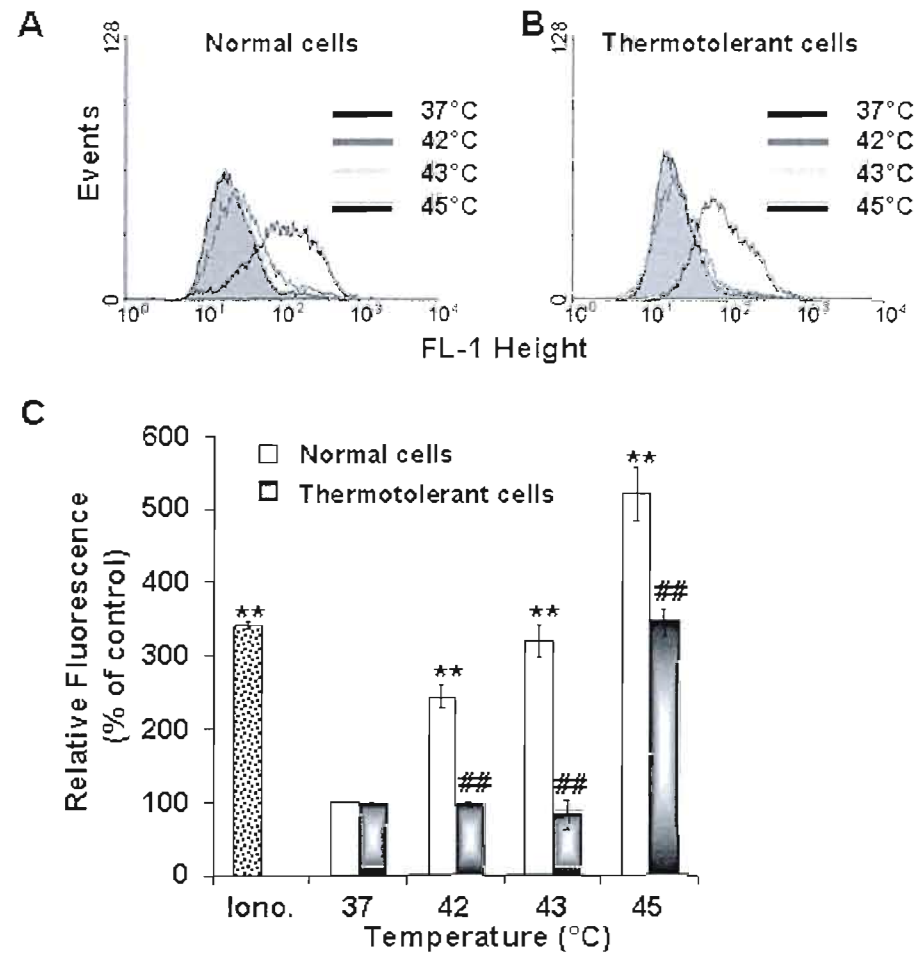
Figure 3: Heat shock induces disruption of calcium homeostasis**Figure 3A-C**

Figure 4: Heat shock induces calpastatin cleavage

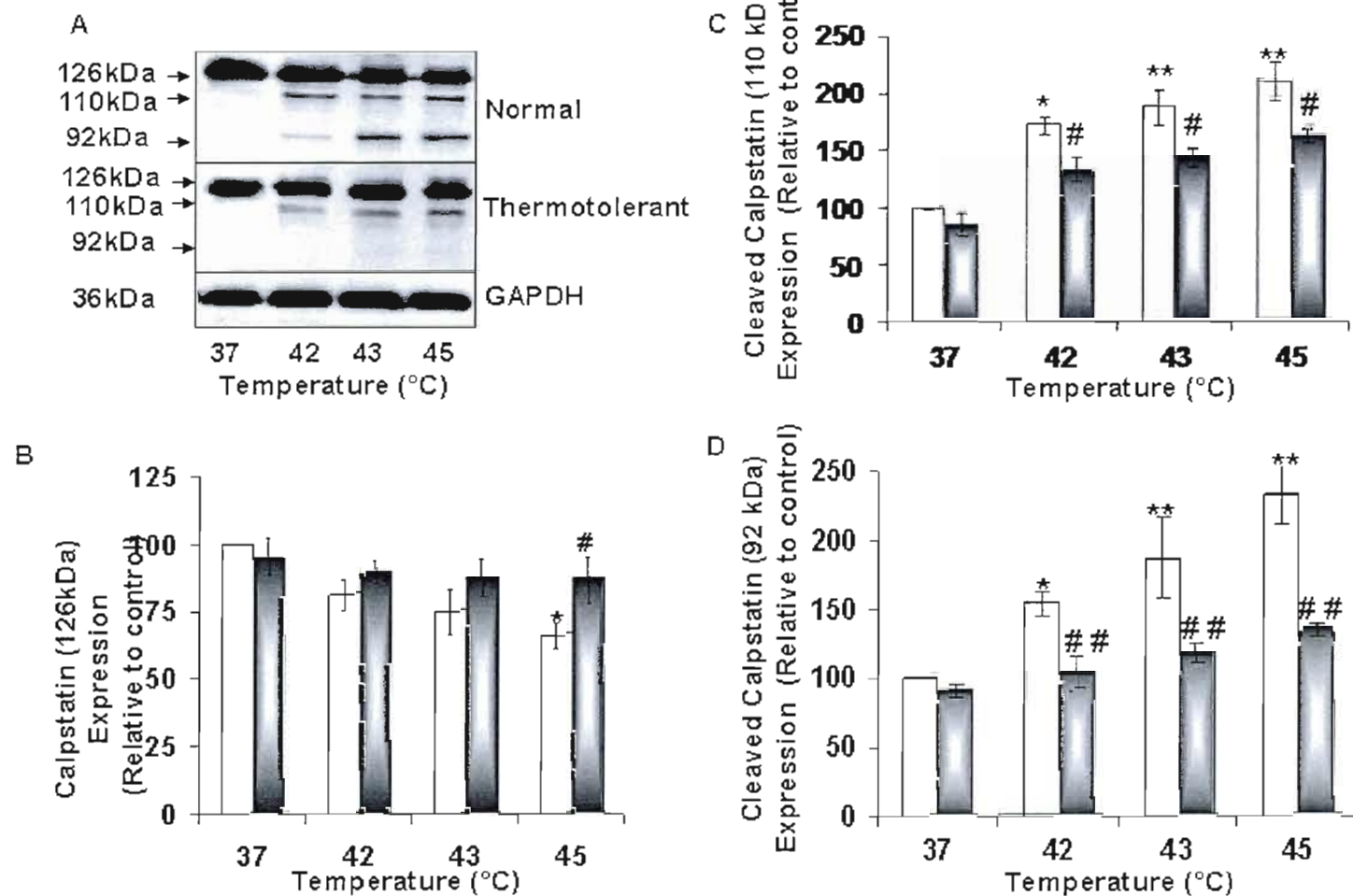


Figure 4A-C

Figure 5: Heat shock induces cleavage of calpain and its translocation to plasma membrane

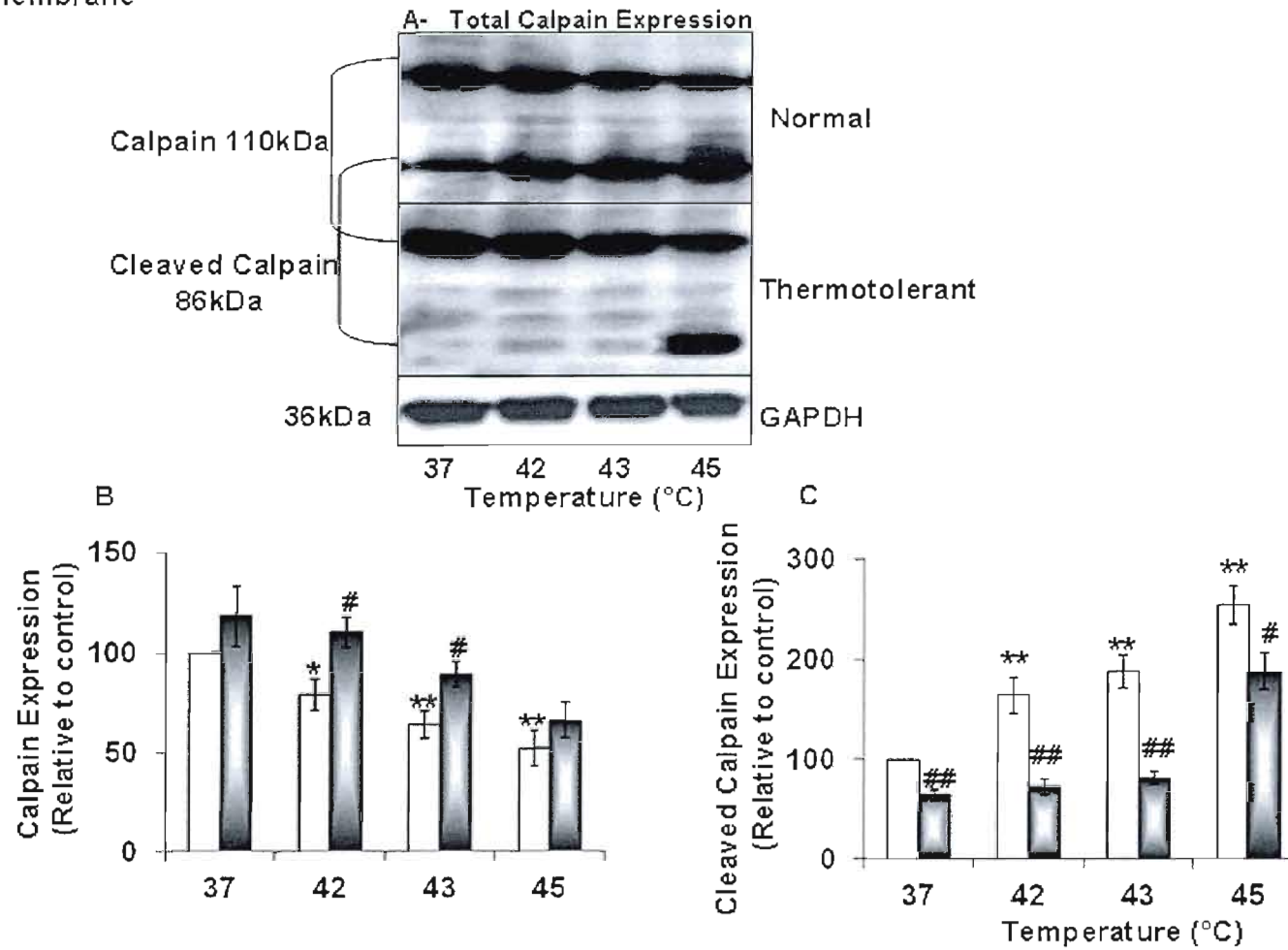


Figure 5A-C

Figure 5: Heat shock induces cleavage of calpain and its translocation to plasma membrane

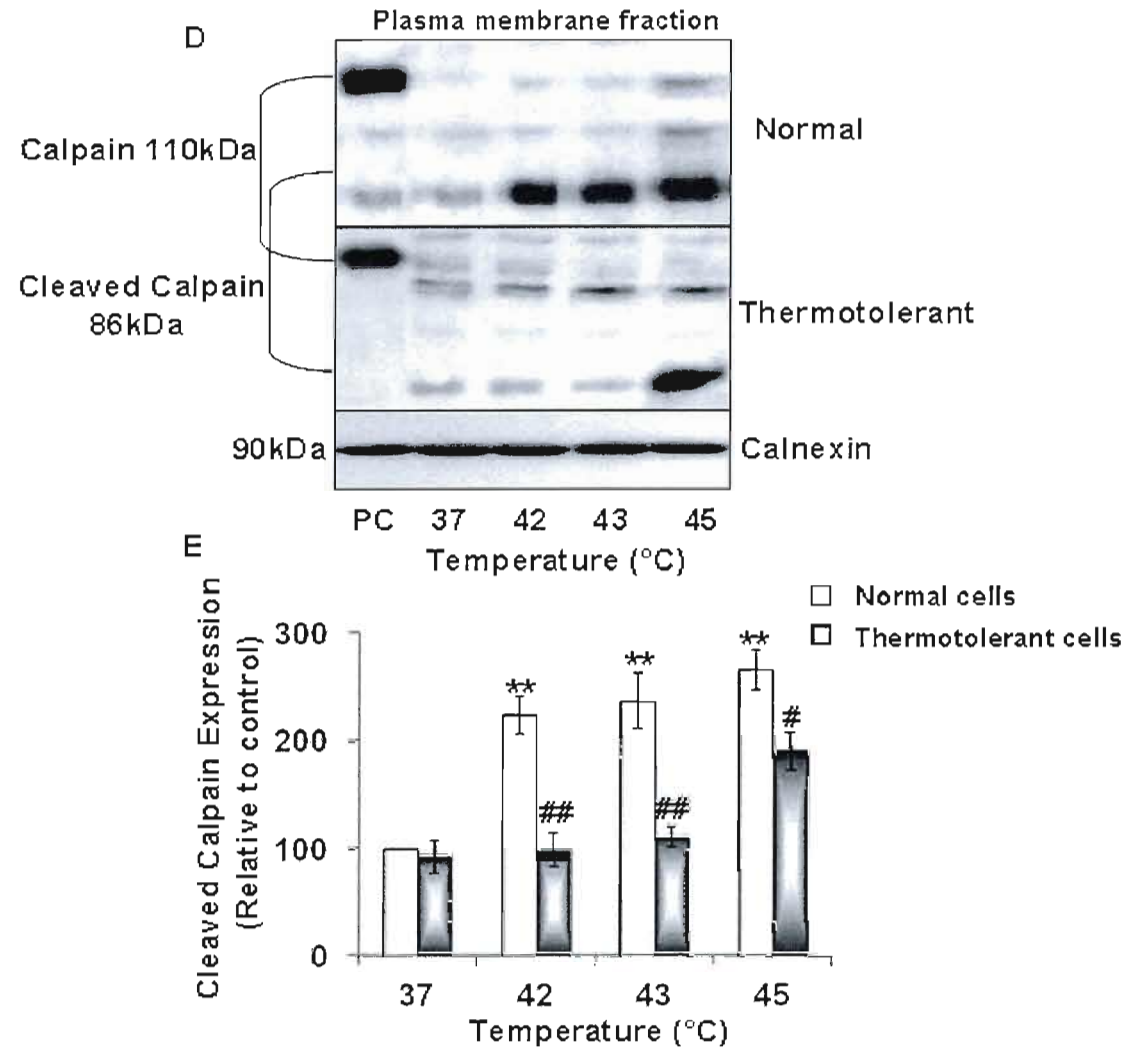


Figure 5D-E

Figure 5: Heat shock induces calpain activity: role of calcium

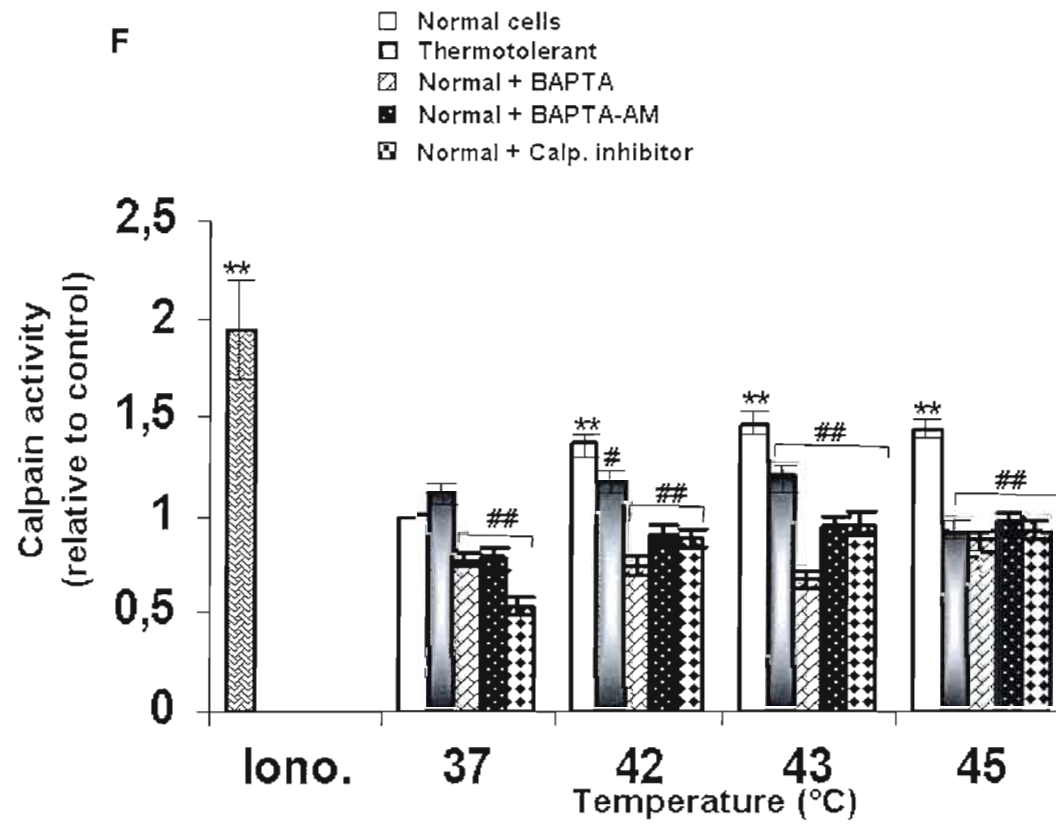


Figure 5F

352 Figure 6: Heat shock induces Vinculin cleavage

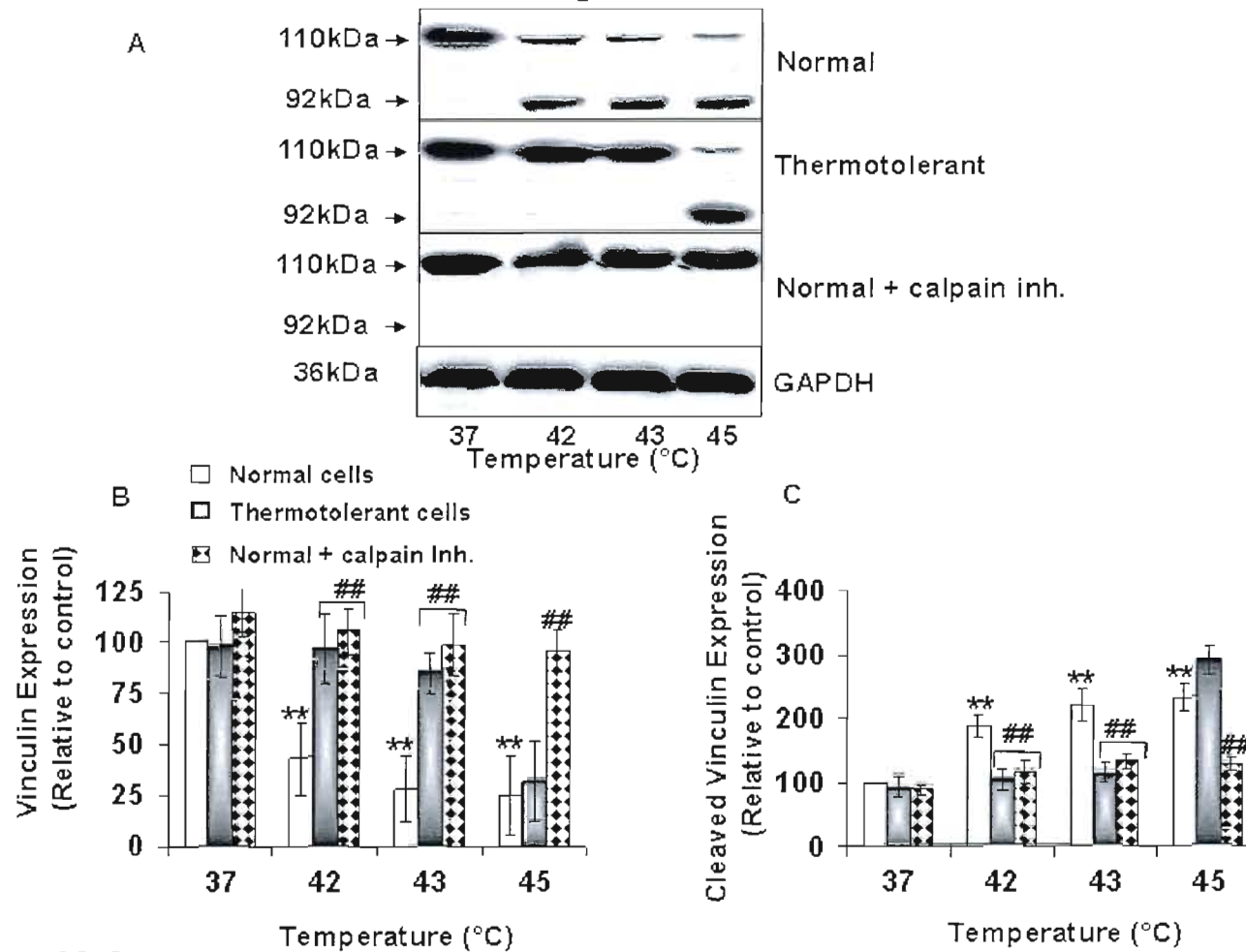


Figure 6A-C

353 Figure 7: Heat shock induces calcium dependent disruption of mitochondrial membrane potential

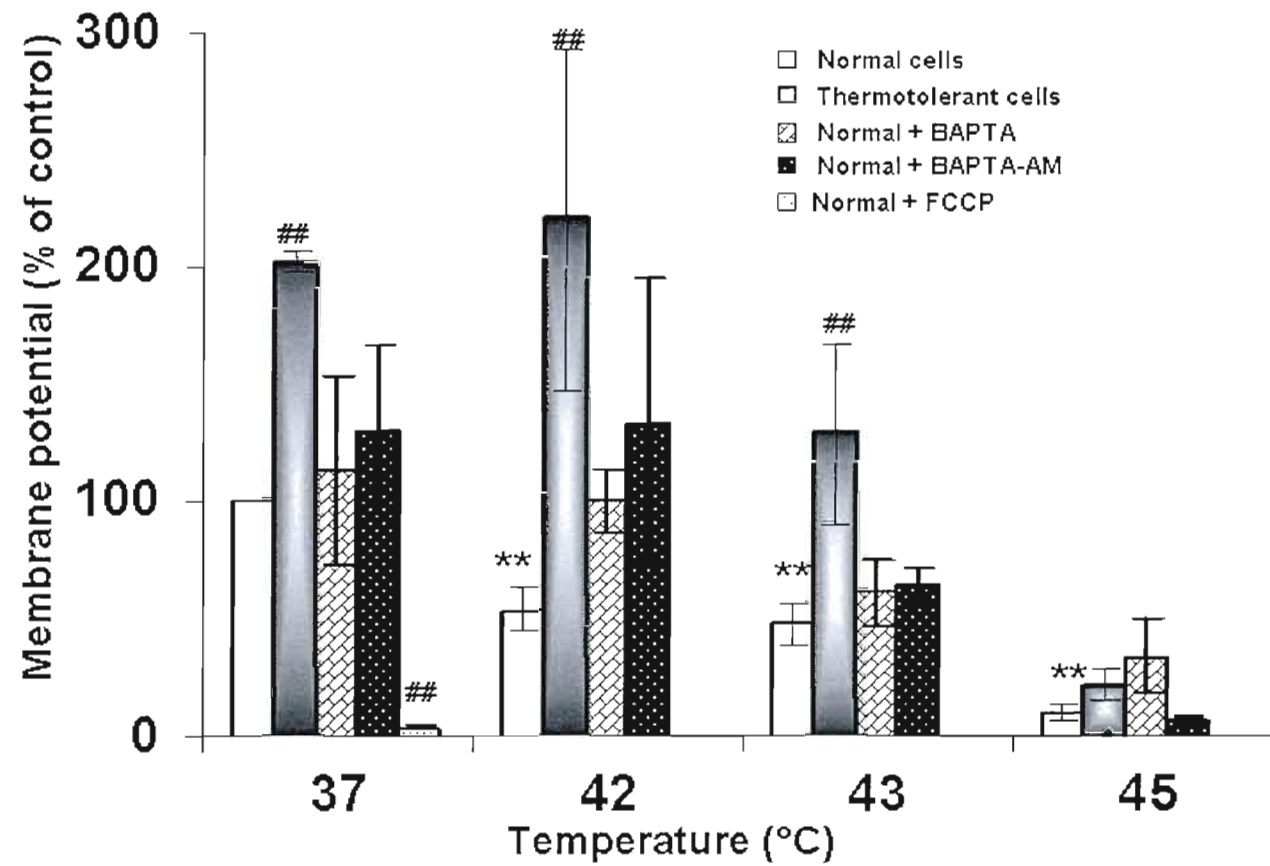


Figure 7

Figure 8: Heat shock induces cleavage of caspase 4 and 12

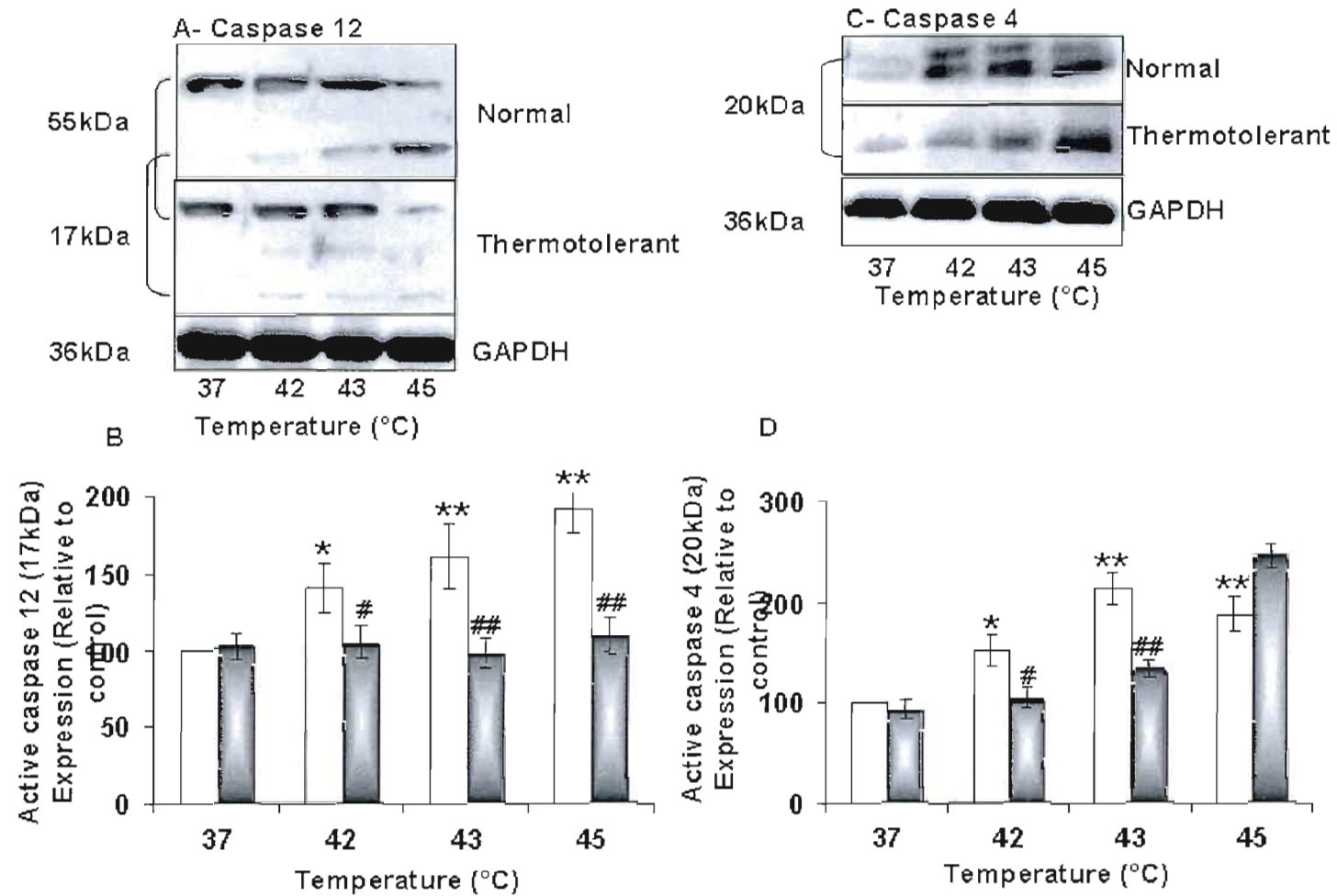


Figure 8A-D

Figure 9: Heat shock activates caspases 4 and 12: role of calcium

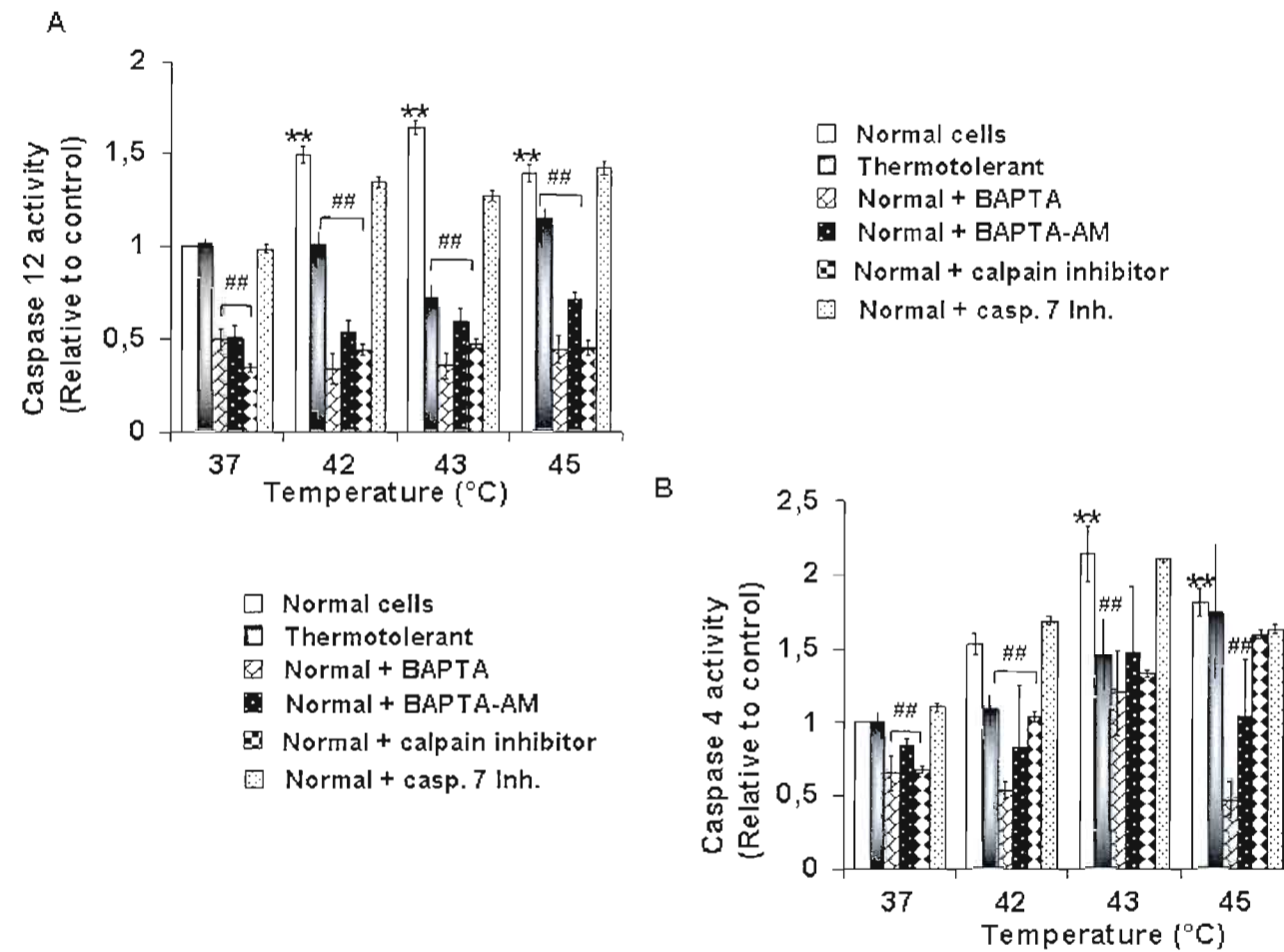


Figure 9A-B

Figure 9: Heat shock activates caspase 7

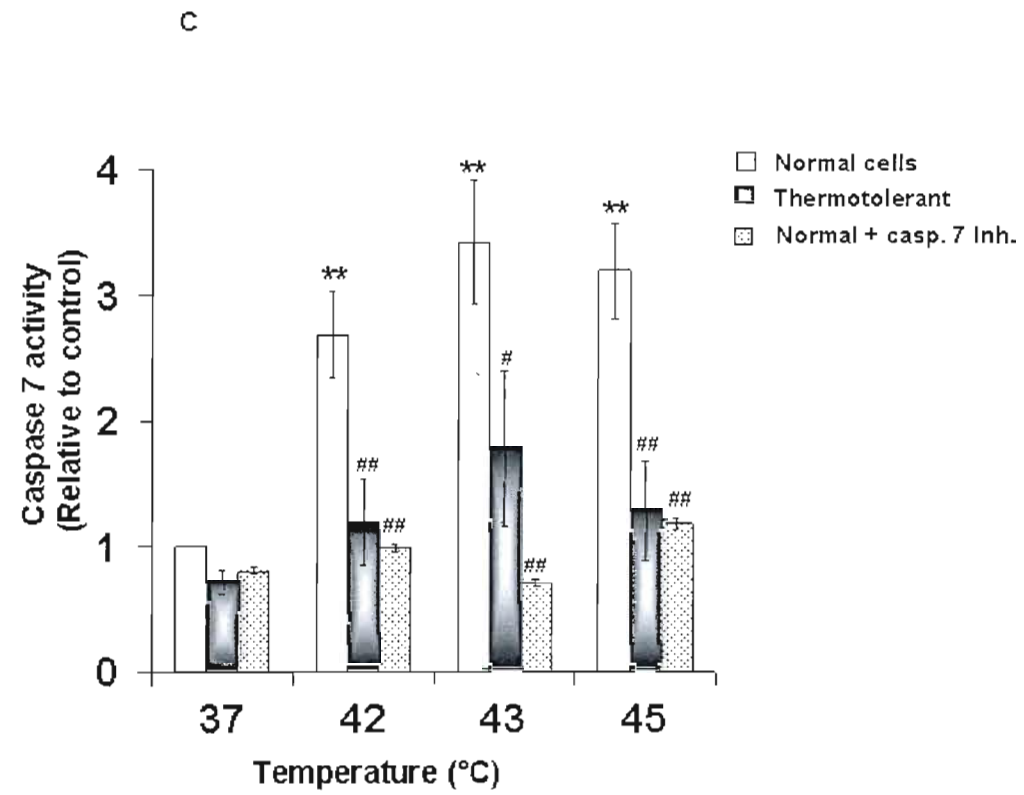


Figure 9C

Figure 10: ASK-1 and Traf-2 are not required for activation of caspase 4 and caspase 12

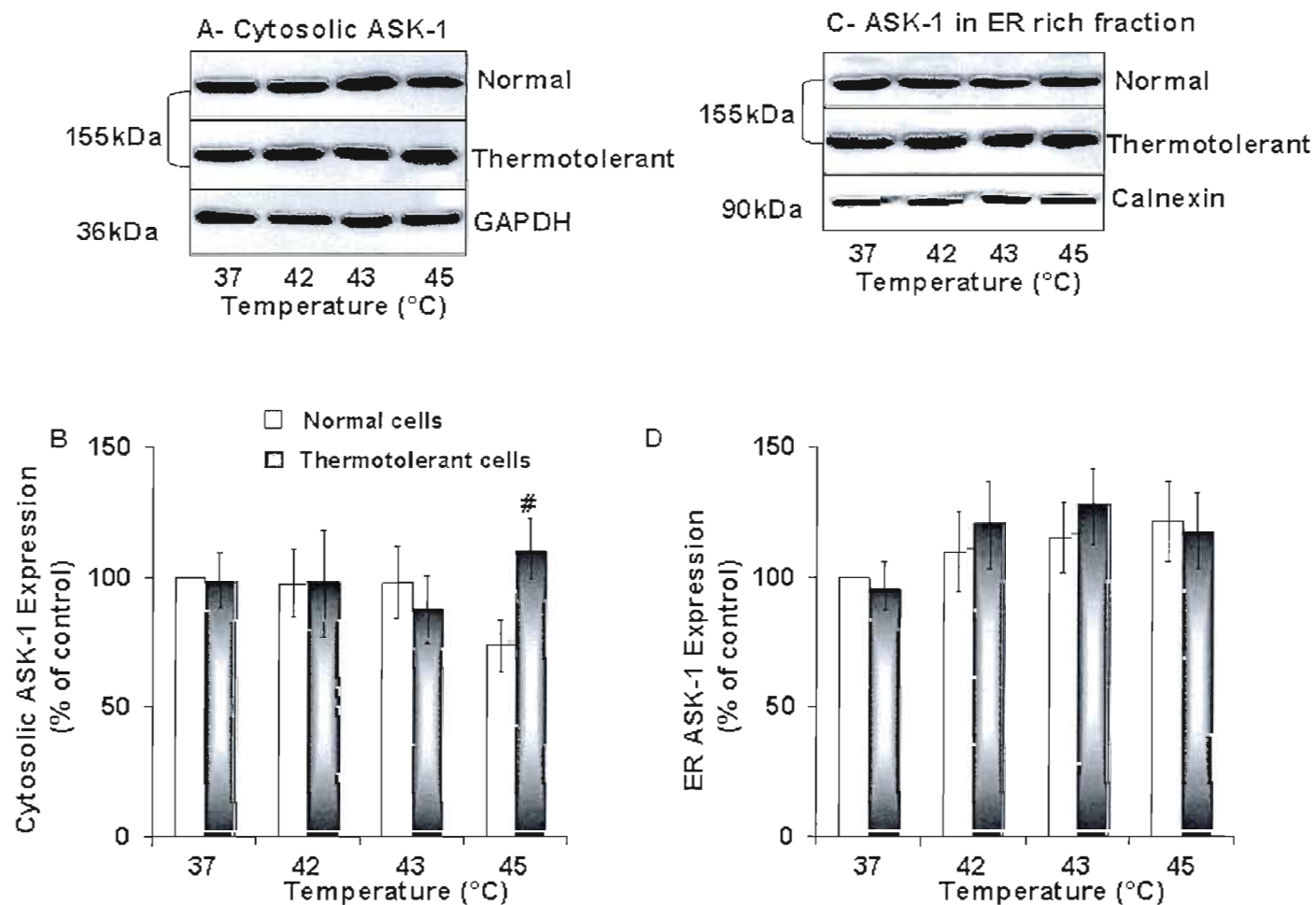


Figure 10A-D

Figure 10: ASK-1 and Traf-2 are not required for activation of caspase 4 and caspase 12

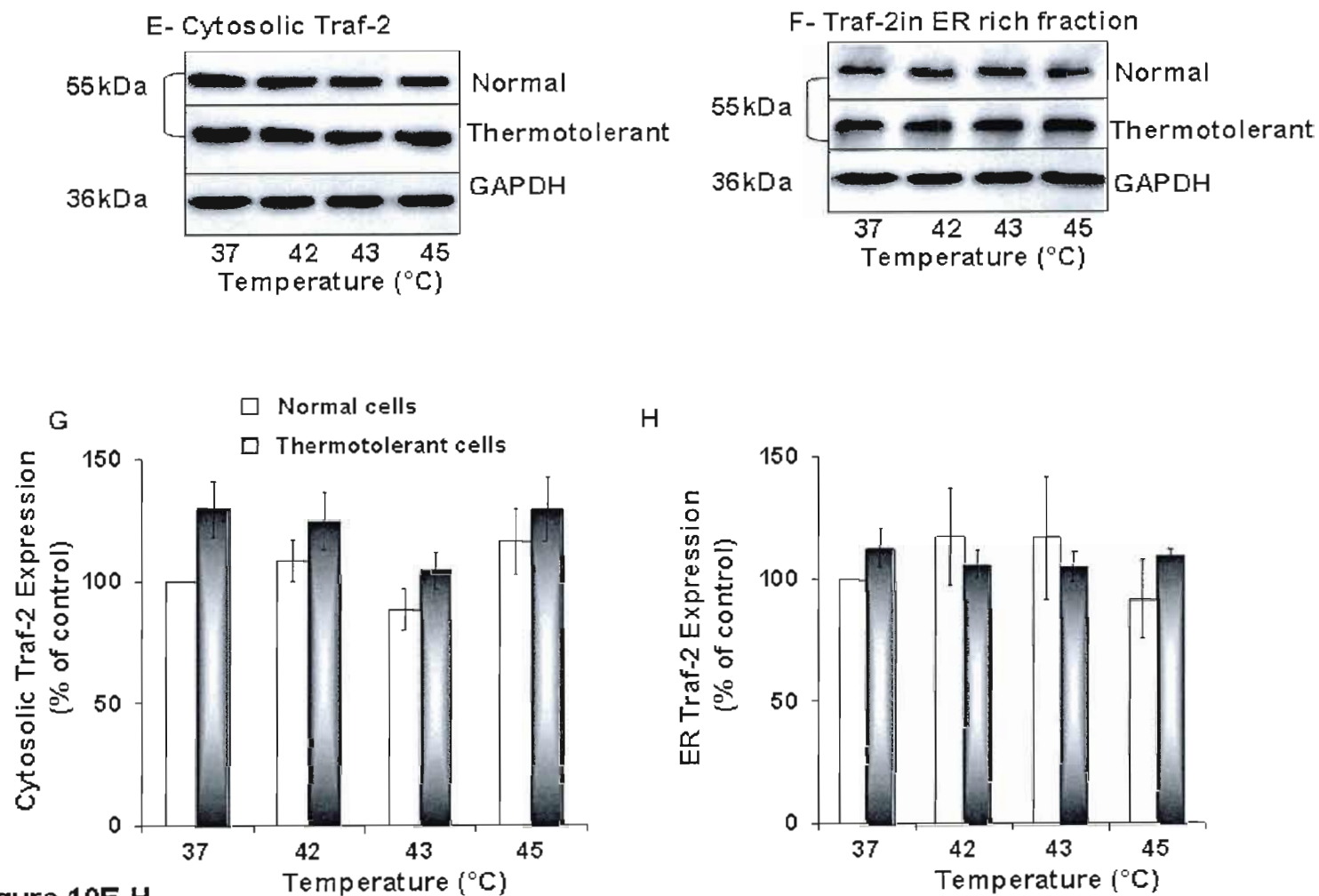


Figure 10E-H

Figure 10: ASK-1 and Traf-2 are not required for caspase 4 and caspase 12 activities

I

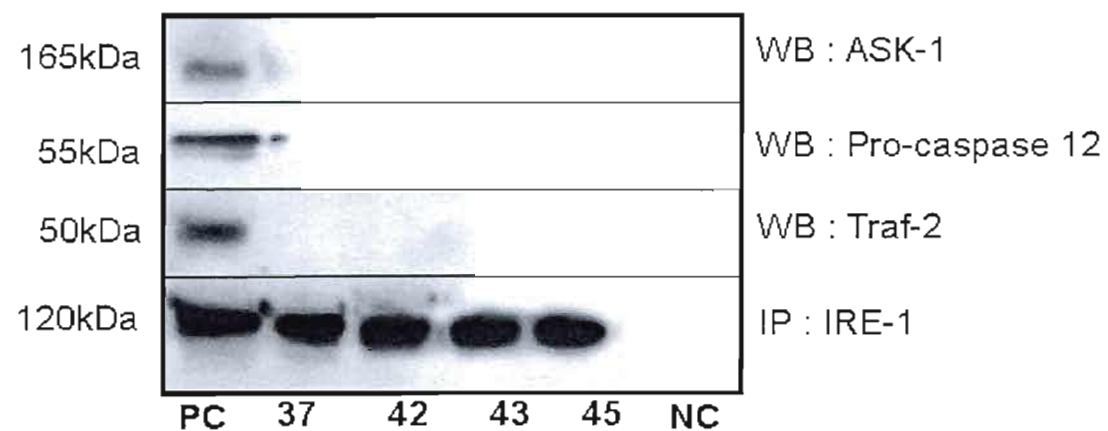


Figure 10I

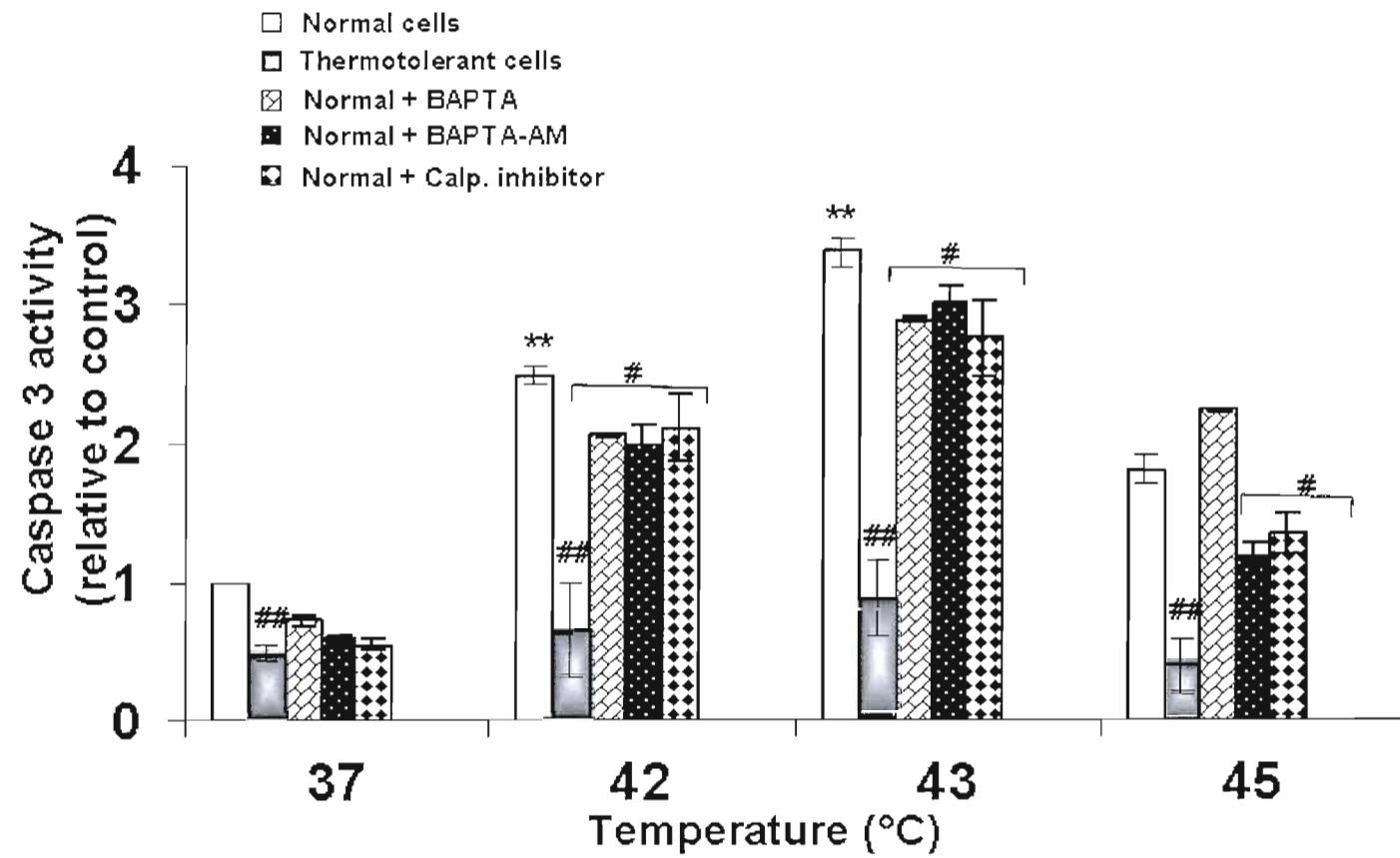
Figure 11: Calcium does not mediate caspase 3 activation**Figure 11**

Figure 12: Heat shock induces chromatin condensation

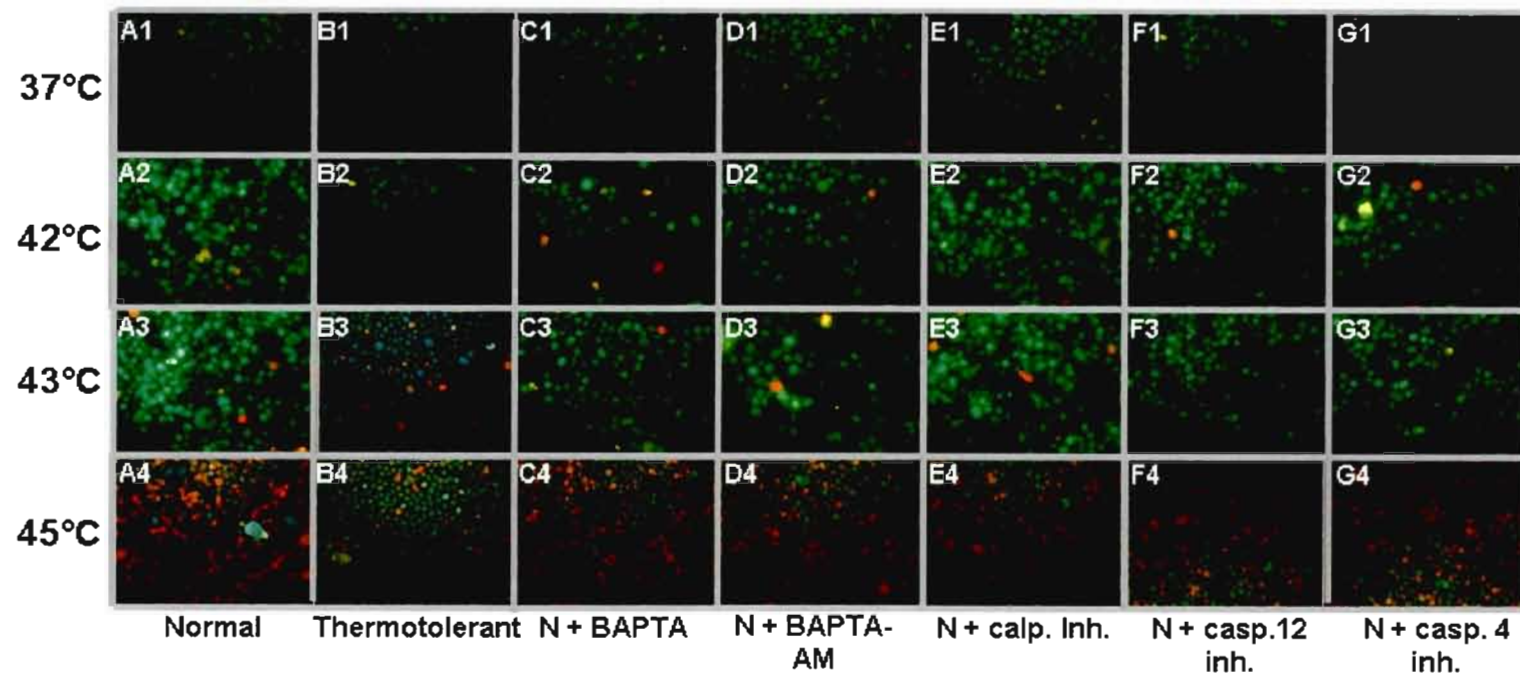


Figure 12A-G

362 **Figure 12: Heat shock induces chromatin condensation**

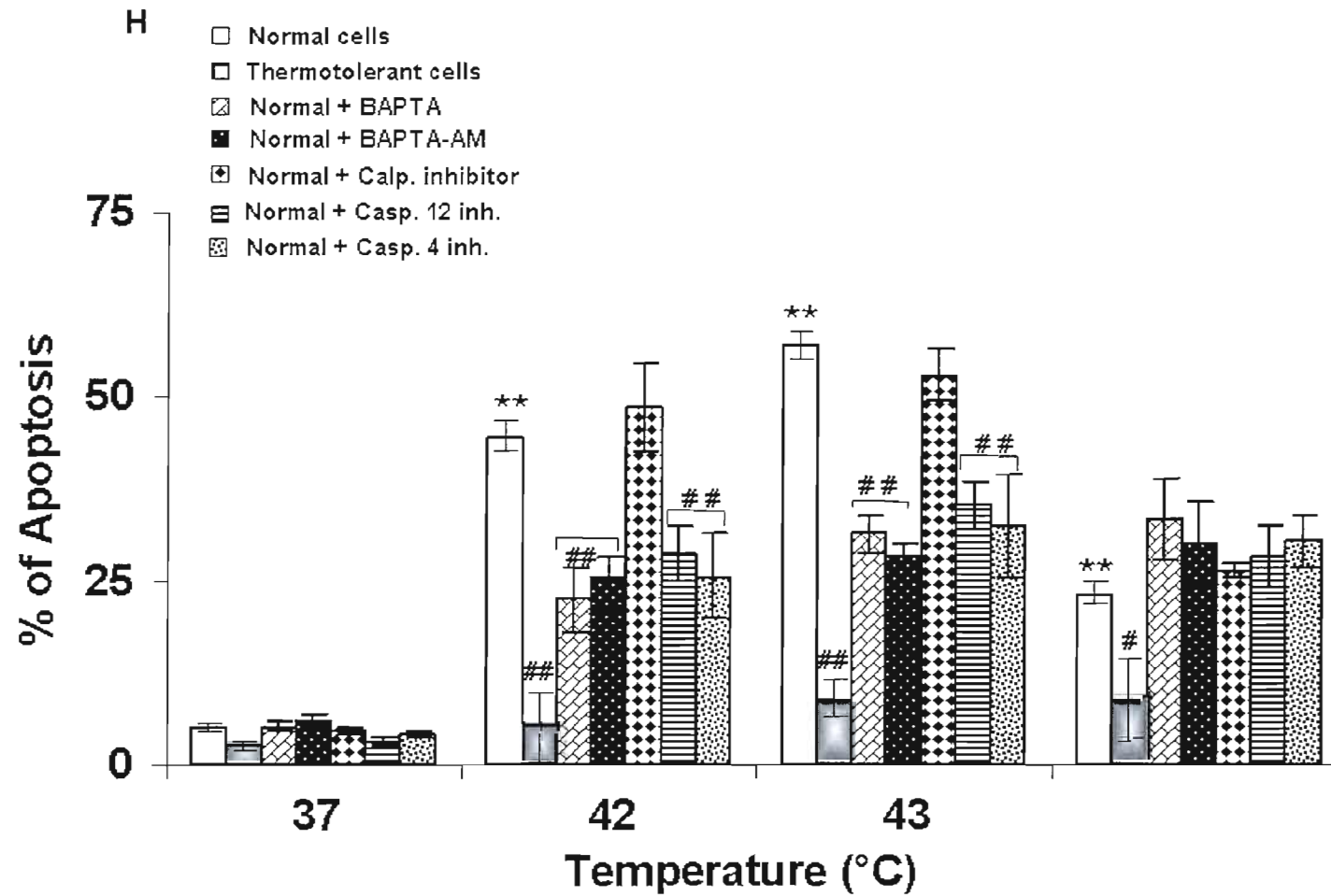


Figure 12H

Figure 12: Heat shock induces necrosis

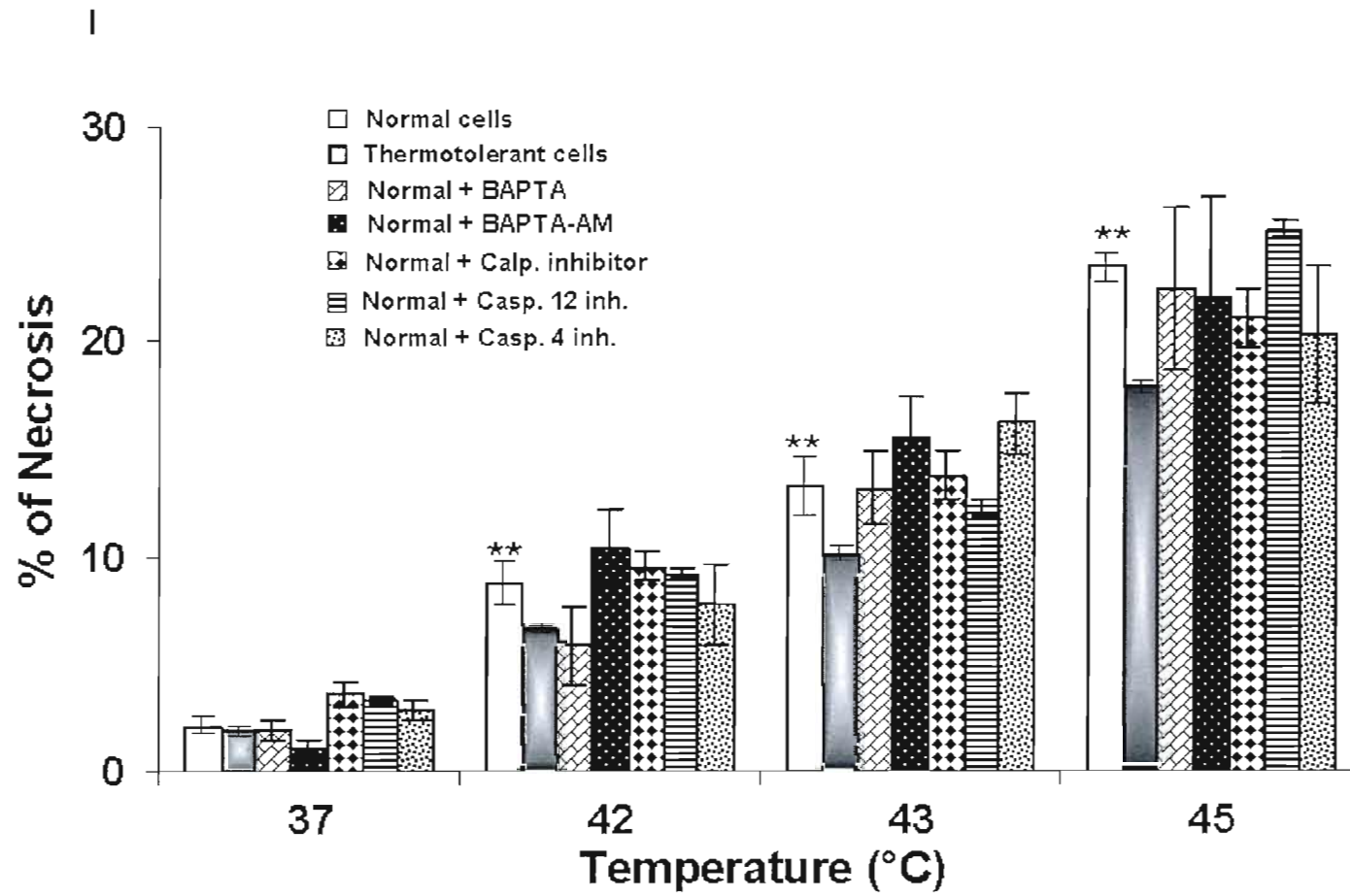
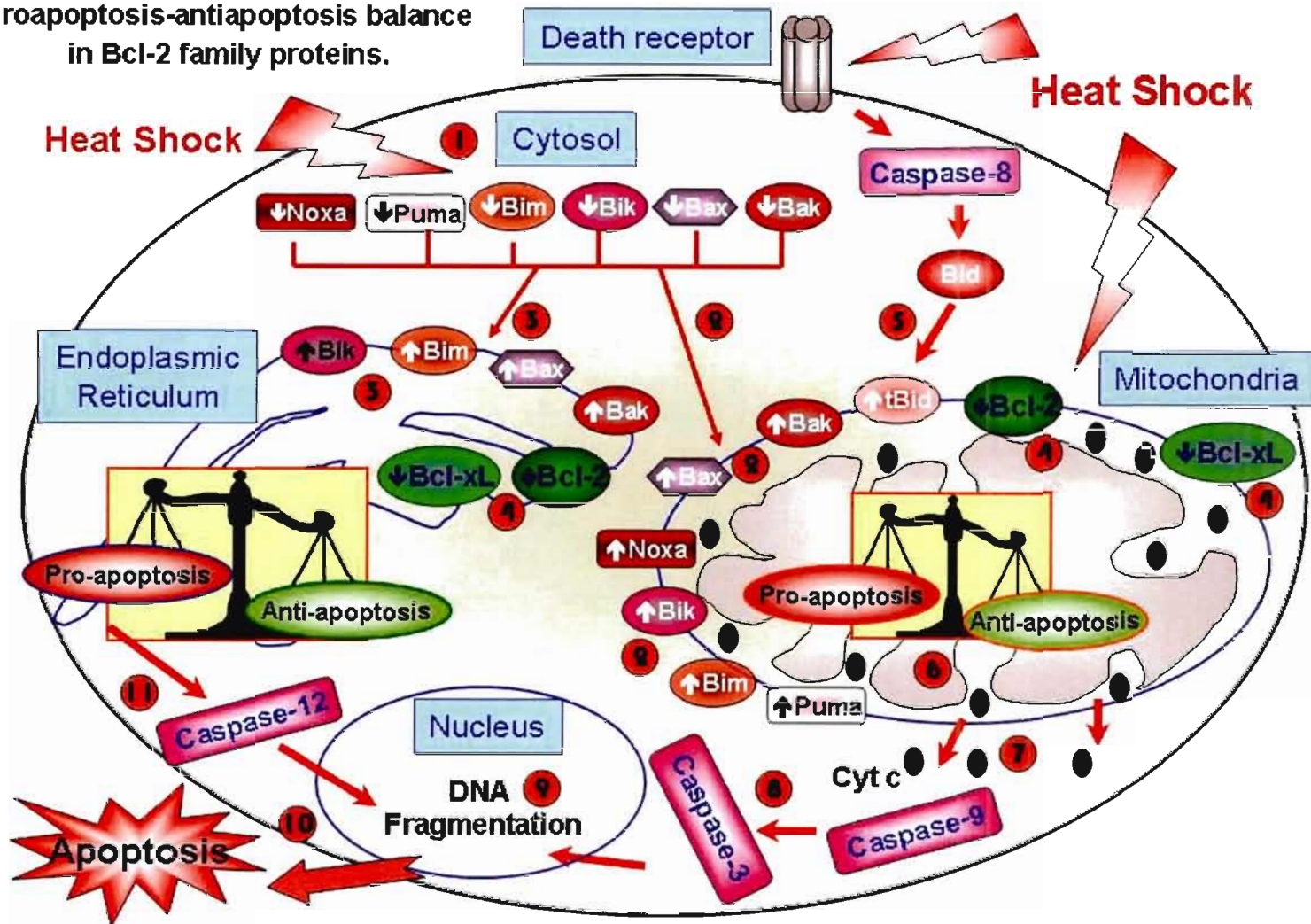


Figure 12I

Scheme 1: Heat shock alters the proapoptosis-antiapoptosis balance in Bcl-2 family proteins.



CHAPITRE X : DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail fut initialisé, comme nous l'avons annoncé dans l'introduction, par le désir de trouver un nouveau traitement biologique contre les maladies cancéreuses. Cependant, dans une perspective fondamentale, et afin d'améliorer ce traitement, la compréhension des mécanismes de cytotoxicité du choc thermique et l'effet protecteur contre divers type de stress que la thermotolérance pourrait procurer aux cellules sont aussi importants.

1-Mécanismes de toxicité du choc thermique : l'activation de la voie mitochondriale est amplifiée par l'induction de la voie du récepteur de mort Fas:

L'étude des effets du choc thermique a débuté il y a plusieurs années. Cependant, bien que de nombreux travaux ont montré que l'hyperthermie pourrait servir comme adjuvant aux autre possibilités thérapeutiques (Hermisson and Weller 2000; Romanucci, Marinelli et al. 2006; Calderwood and Ciocca 2008), très peu d'études ont investigué en détail les mécanismes moléculaires et biochimiques de la toxicité du choc thermique. Nous pouvons ainsi décidé d'approfondir nos connaissances sur l'hyperthermie afin de mieux s'en servir en clinique. A cette fin, nous avons fait des tests de toxicité à 43°C sur diverses lignées cellulaires (les cellules d'une lignée de carcinome malpighien épidermoïde du col de l'utérus de type HeLa, cellules de l'ovaire du hamster chinois CHO, cellules cancéreuses pulmonaires A549, cellules cancéreuses de la vessie T24). Les résultats obtenus montrent qu'à partir de 60 minutes une perte importante de la viabilité se manifeste chez toutes les lignées cellulaires testées (Figures 10.1 et 10.2). Cependant, les mêmes cellules, pré-incubées pendant trois heures à 40°C éprouvent une résistance marquante à un choc thermique subséquent. Le développement d'une telle résistance est accompagné par l'augmentation du niveau d'expression de plusieurs protéines de choc thermiques entre autre : la HSP 27, 32, 60, 70, 90 et 110. Le degré de thermo-résistance varie

d'un type cellulaire à un autre, ce qui suscite un intérêt grandissant pour le phénomène de thermotolérance, ses mécanismes, ses conséquences et comment en profiter. En effet, la résistance des cellules rendues thermotolérantes ne se limite pas au choc thermique mais également à d'autres types de stress, notamment le stress oxydatif, puisque l'induction des protéines du choc thermique s'avère, selon plusieurs travaux de recherches, responsables d'un phénomène de tolérance au stress oxydatif, au stress des métaux lourds et aux radiations (Sherman and Multhoff 2007; Asea 2008). Bien que la majorité de ces études réussissent à induire l'expression des HSPs, des altérations de la viabilité de cellules est souvent la limite de ces méthodes malgré la courte durée d'exposition. En effet, l'augmentation du niveau d'expression des HSPs s'accompagne de la perte de viabilité cellulaire si la thermotolérance est induite à de fortes températures ($\geq 45^{\circ}\text{C}$).

Des travaux plus approfondis sur la lignée cancéreuse HeLa ont permis de déterminer que le choc thermique induit la mort cellulaire par apoptose à des températures inférieures à 45°C . Au delà de 45°C , la mort cellulaire est majoritairement nécrotique. Des résultats similaires ont été obtenus chez la lignée cellulaire non cancéreuse mais immortalisée CHO. De plus, le choc thermique induit les trois voies de l'apoptose, à savoir la voie mitochondriale, la voie du RE et la voie extrinsèque médiée par le récepteur de mort Fas. L'étude des voies intrinsèque dans un premier temps, et extrinsèque dans un deuxième temps, a donc été effectuée dans le but de déterminer le mécanisme exact de cytotoxicité du choc thermique. Nous avons également mis en évidence l'ordre d'événement menant à l'apoptose suite au choc thermique. Ceci nous a permis d'établir un modèle de signalisation de l'apoptose induite par l'hyperthermie létale. Trois voies d'apoptose sont induites suite à l'exposition au choc thermique : une voie mitochondriale précoce, qui survient suite à la chute du potentiel membranaire et la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Suite au relargage du cytochrome c, la caspase 9 est activée et résulte en l'activation de la caspases-3 et au clivage de PARP et de l'ICAD.

La deuxième voie apoptotique est déclenchée par le récepteur de mort Fas. Elle est caractérisée par l'activation des caspases 8, 10 et 2 et le clivage de Bid. La translocation de Bid tronqué au niveau de la mitochondrie amplifie la voie intrinsèque de l'apoptose. Or l'activation de la caspase 8 pourrait se manifester suite à l'induction du récepteur Fas, du récepteur TNF ou également de la protéine Bap31, localisée au niveau du RE (Chandra, Choy et al. 2004). De ce fait, pour déterminer laquelle des voies est responsable de l'induction de l'activité de la caspase 8, nous avons utilisé un antagoniste du récepteur Fas (Kp7-6) qui se lie avec une affinité comparable au récepteur et à son ligand. Les résultats ont montré une inhibition complète de l'activité de la caspase 8, ce qui laisse présumer que l'activation de cette dernière survient suite à la trimérisation du récepteur de mort Fas après l'association avec son ligand. Des analyses par immunoprécipitation ont démontré la formation du complexe de signalisation (DISC) suite au recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de la procaspase 8 à la membrane. Ceci explique le clivage de la procaspase 8 et l'augmentation de l'activité enzymatique de la caspase 8 observée par western Blot et spectrofluorométrie, respectivement. De même, le clivage de Bid en tBid au niveau du cytosol et l'augmentation du taux d'expression de ce dernier dans la fraction mitochondriale ont effectivement confirmé l'activation de la caspase 8 par la voie du récepteur de mort Fas. Cette conclusion tient sa validité du fait que l'inhibition de Fas par Kp7-6 a inhibé l'activité de la caspase 8 et que l'inhibition de l'activité de cette dernière a inhibé le clivage de Bid, aussi inhibé par Kp7-6. Nous avons également observé une baisse de la quantité de Bax transloqué au niveau de la mitochondrie et une réduction du taux de cytochrome C relâché dans le cytosol. Dans le même ordre d'idée, l'antagoniste de Fas et l'inhibiteur spécifique de la caspase 8 ont également réduit l'activité des caspases 9 et 3 de même que le taux de clivage d'ICAD et de PARP. Le taux de condensation de chromatine et le nombre de cellules apoptotiques ont également baissé suite à l'utilisation de ces inhibiteurs. Ceci permet de répondre au point soulevé par le premier objectif de cette étude qui teste

l'hypothèse d'une stimulation d'une voie mitochondriale indépendante de la voie du récepteur Fas par le choc thermique mais que celle-ci l'amplifie.

Il est important de mentionner que l'utilisation de l'inhibiteur général des caspases (Z-VAD) a baissé le taux de cellules apoptotiques et nous a permis de conclure que la condensation de la chromatine est caspase-dépendante. Cependant, alors qu'environ 40 % des cellules sont apoptotiques à 42 et 43°C après seulement deux heures d'exposition au choc thermique, environ 45 % des cellules meurent par nécrose à 45°C, comme le montre le marquage à l'iodure de propidium. Cette observation semble indiquer les limites à atteindre lors d'un traitement du cancer par l'hyperthermie afin d'éviter l'établissement d'une réaction inflammatoire dans le tissu traité.

2-Mécanismes de toxicité du choc thermique : la génération de ROS:

Par ailleurs, nos travaux démontrent clairement pour la première fois l'implication des ROS dans l'induction de l'apoptose par le choc thermique. À ce chapitre, bien qu'elles soient peu nombreuses, les études sur la toxicité du choc thermique, démontrent que chez certaines lignées cellulaires, le taux de ROS peut augmenter suite à l'exposition des cellules à des hautes températures (Flanagan, Moseley et al. 1998; Lord-Fontaine and Averill 1999; Moriyama-Gonda, Igawa et al. 2000). Toutefois, la génération des ROS peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou d'activité enzymatique touchant la NADPH oxydases, les lipoxygénases ou les NO synthétases (Rutkowski, McNamee et al. 2007). Les ROS peuvent également faciliter la perturbation de la membrane mitochondriale et favoriser ainsi l'ouverture des canaux (Kim, Emi et al. 2006).

Ainsi, les sources de générations intracellulaires des ROS pourraient être étudiées afin de déterminer leur implication dans les mécanismes de toxicité du choc thermique et leurs rôles dans la génération des céramides.

3-Mécanismes de toxicité du choc thermique : l'activation des MAP kinases:

À la manière de p53, les ROS sont également connus pour stimuler l'activité de nombreuses kinases faisant le lien entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, depuis leur découverte et jusqu'à tout récemment, on considérait les protéines MAP kinases à l'image d'un système de signalisation contrôlant plusieurs événements dans la cascade signalétique de l'apoptose et qui sont activées par plusieurs stress, entre autres le stress oxydatif. C'est pourquoi on confère aux ROS un rôle majeur dans l'activation et l'entretien des voies de signalisation impliquant les MAP kinases. Il a été démontré par de nombreuses études que l'exposition au choc thermique induisait l'activation des MAPKs suite à une interaction entre les domaines de mort des caspases (DED) et certaines MAP kinases (comme la JNK) ou d'autres protéines kinases (ASK-1) (Temkin and Karin 2007). Nos résultats semblent être en harmonie avec ces travaux.

Dans un premier temps, nous avons investigué le rôle du choc thermique dans l'activation de JNK. Nous avons démontré que l'exposition au choc thermique provoquait la phosphorylation de JNK suite au recrutement de Daxx au récepteur de mort Fas, résultant en l'activation de la protéine Ask-1. L'activation de la voie de JNK conduit à la translocation de Bax vers la mitochondrie et le relargage de cytochrome c. Cependant, le prétraitement à l'inhibiteur de JNK (PD98059) avant l'exposition au choc thermique, protège les cellules HeLa contre la translocation de Bax à la mitochondrie, la chute du potentiel membranaire et le relargage du cytochrome c sans pour autant restaurer la sensibilité des cellules à l'induction de

l'apoptose par le choc thermique (activation de caspase-3 et condensation de la chromatine).

L'activation de la voie de p38 quant à elle, sensibilise les cellules aux effets cytotoxiques du choc thermique en phosphorylant Bcl-2, ce qui l'amène à sa dégradation. L'exposition des cellules HeLa à l'inhibiteur de p38 (SB328020) avant le traitement au choc thermique, a protégé les cellules contre la dégradation de Bcl-2 mais ne les a pas protégé contre la chute du potentiel membranaire, ni le relargage du cytochrome c dans le cytosol. Similairement, l'inhibiteur de la p38 n'a pas inhibé les événements apoptotique survenus en aval du relargage du cytochrome c (activation de caspase-3 et condensation de la chromatine). De plus, la translocation de p38 au niveau du noyau suggère qu'elle joue un rôle dans la transcription de facteurs pro-apoptotiques. En effet, il a été démontré que l'activation de p38 induit la synthèse des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL1, l'IL6 et l'IL8 soit par activation directe de la transcription des gènes soit par stabilisation de l'ARNm via son substrat MAPKAK 2 (MAP kinase-activated protein kinase 2)(Schindler, Monahan et al. 2007).

Sachant que l'activation des MAP kinases pourrait survenir suite à l'augmentation du taux des radicaux libres qui dérivent de l'accumulation des céramides (Ballou, Lauderkind et al. 1996; Ruvo 2003); le lien entre ces trois facteurs pourrait amener une explication plus profonde des mécanismes de toxicité du choc thermique. En effet, il a été démontré que les céramides ou leurs métabolites peuvent agir comme des seconds messagers interagissant avec la signalisation MAP kinases. La sphingosine, par exemple, est capable d'orienter la cellule vers l'apoptose en activant la voie des JNK (Westwick, Bielawska et al. 1995; Coroneos, Wang et al. 1996; Verheij, Bose et al. 1996; Shen, Godlewski et al. 2003). Des études ont montré que d'autres métabolites des céramides entre autre, les gangliosides D3 (GD3), peuvent s'accumuler à la surface des mitochondries et d'activer la voie intrinsèque de

l'apoptose en stimulant la génération des ROS (Garcia-Ruiz, Colell et al. 1997; De Maria, Rippo et al. 1998; Rippo, Malisan et al. 2000; Malisan and Testi 2002).

A part, leurs actions indirectes, les céramides peuvent transmettre un signal pro-apoptotique par action directe en stimulant les protéines kinases activées par les céramides (CAPK pour : Ceramide activated protein kinase) (Mathias, Dressler et al. 1991; Mathias and Kolesnick 1993) et les protéines phosphatases activées par les céramides (CAPP pour Ceramide activated protein phosphatase) (Dobrowsky and Hannun 1993). Une fois activées, ces enzymes transmettent le signal de mort selon 2 voies distinctes. La première implique le facteur de transcription c-Jun. En effet, les protéines CAPKs activent JNK qui a son tour phosphoryle et active c-Jun résultant en l'induction l'expression de plusieurs facteurs pro-apoptotiques entre autre Bax et p53, (Sawai, Okazaki et al. 1995; Kondo, Matsuda et al. 2000; Ruvolo 2001).

La deuxième voie met en jeu les protéines Bcl-2 et la mitochondrie. En effet, au cours du processus apoptotique, l'accumulation intracellulaire de céramides est souvent associée à une altération de la fonction mitochondriale, caractérisée par la chute du potentiel membranaire, la génération des radicaux libres et la libération de facteurs pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF, etc) via les pores de transition mitochondriaux PTM. Il a été montré notamment que les céramides accumulées dans le cytoplasme, via l'activation de CAPP, peuvent inhiber la voie de survie médiée par la protéine kinase B (PKB)/Akt. L'inhibition de la voie de survie Akt permet à la protéine Bad de se relocaliser au niveau de la membrane mitochondriale et d'établir les pores de transition mitochondriaux (Zundel and Giaccia 1998; Salinas, Lopez-Valdaliso et al. 2000; Zundel, Swiersz et al. 2000). Des expériences complémentaires au moyen de l'inhibiteur de céramides permettront de déterminer plus en détail le rôle de ces derniers dans la régulation de la cascade apoptotique mettant en jeux les MAP kinases.

4-Mécanismes de toxicité du choc thermique : la génération des céramides pourrait être la clé ?

D'un autre côté, l'augmentation du taux de ROS après le choc thermique nous a permis d'orienter nos futures recherches vers la voie du TNF α , TRAIL et la voie des sphingomyélines-céramides. Ces voies sont connues pour leur potentiel à générer des espèces réactives de l'oxygène (Thevissen, Francois et al. 2006). En effet, Il a été démontré que la voie du TNF (Corda, Laplace et al. 2001) et la voie de TRAIL (Lee and Amoscato 2004; Moulin, Dumontet et al. 2007) induisent la génération des céramides qui à leur tour induisent la génération de ROS. Le mode d'action et la régulation de la production des céramides ont été particulièrement investigués au cours des dix dernières années, du fait d'un rôle émergent des céramides comme effecteur moléculaire de l'apoptose. Plusieurs études ont montré, en effet, une production de céramides intracellulaires dans les cellules apoptotiques, précédant l'apparition des atteintes biochimiques et morphologiques de l'apoptose, suggérant que les céramides peuvent être impliquées dans la transduction du signal menant à la mort cellulaire (Hannun 1996; Kolesnick and Kronke 1998; Mathias, Pena et al. 1998; Massiello, Salas et al. 2004). D'autres études suggèrent que les céramides peuvent avoir une action directe sur les mitochondries en stimulant le relargage du cytochrome c (Garcia-Ruiz, Mari et al. 2000). L'accumulation de céramides au niveau de la membrane mitochondriale peut aussi mener au découplage des complexes de la chaîne respiratoire menant à la formation de radicaux libres (Garcia-Ruiz, Colell et al. 1997; Michel, van Echten-Deckert et al. 1997).

L'accumulation de céramides résulte de l'activation de la biosynthèse *de novo* ou de l'hydrolyse de sphingomyélines par diverses sphingomyélinases. Les céramides générées *de novo* s'accumulent majoritairement au niveau du feuillet membranaire cytoplasmique du réticulum endoplasmique du fait de la présence à ce niveau d'enzymes intervenant dans le métabolisme des céramides, à savoir la désaturase et la dihydrocéramide réductase (Michel, van Echten-Deckert et al. 1997). On retrouve

également, en fonction du type cellulaire, une accumulation de céramides associées à une activité sphingomyélinase dans les lysosomes (ASMase) (Kanfer 1965), le noyau (NSMase) (Tamiya-Koizumi, Umekawa et al. 1989; Alessenko and Chatterjee 1995) et les mitochondries (NSMase) (Birbes, El Bawab et al. 2001).

L'activation de ces voies enzymatiques peut être modulée par des stimuli physiologiques ou environnementaux. Il a été démontré que la voie de synthèse de novo peut être activée après stimulation au TNF- α (Xu, Yeh et al. 1998) à la daunorubicine (Bose, Verheij et al. 1995), l'hexadécylphosphocholine (Wieder, Orfanos et al. 1998) l'étoposide (Perry, Carton et al. 2000), les radiations ionisantes (Farrell, Uchida et al. 1998), les lymphotoxines (Plo, Ghandour et al. 1999), et également le choc thermique (Chang, Abe et al. 1995; Kondo, Matsuda et al. 2000). Ces stimuli se traduisent par l'augmentation de l'activité des enzymes sérine-palmitoyl transférase et céramide synthase associées généralement à une augmentation de leur niveau d'expression, suggérant l'implication de certains facteurs transcriptionnels comme p53 (Paumen, Ishida et al. 1997; Kolettas, Skoufos et al. 2006; Temme, Rodriguez et al. 2007). Ainsi, il serait intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires conduisant à la génération de céramides par le choc thermique (en particulier le rôle de TNF- α) et d'identifier leurs mécanismes de toxicité et leur implication dans la toxicité du choc thermique.

5-Mécanismes de toxicité du choc thermique : Activation de la voie du RE:

Nos résultats viennent soutenir d'autres études montrant le rôle du choc thermique dans l'activation des protéines kinases que ce soit libre dans le cytosol ou ancrée à des membranes comme la PERK impliquée dans le stress du réticulum endoplasmique. PERK est connu pour phosphoryler le facteur de transcription eIF α lors d'un stress du RE. Cependant, il a été démontré que l'exposition des cellules CHO à des températures élevées cause en plus de l'arrêt de la synthèse des protéines, la phosphorylation et l'activation de eIF α (Murtha-Riel, Davies et al. 1993). Par

ailleurs, d'autres travaux ont montré le rôle du choc thermique dans la perte de l'homéostasie calcique (Drummond, McClure et al. 1986; Stevenson, Calderwood et al. 1986; Stevenson, Calderwood et al. 1987; Drummond, Livingstone et al. 1988; Mikkelsen, Reinlib et al. 1991). La phosphorylation du facteur eIF α et la perte de l'homéostasie calcique observée par ces auteurs et l'induction de l'apoptose observée dans nos travaux suggèrent qu'un choc thermique doux induit un stress du RE alors qu'un choc thermique assez rigoureux induit l'apoptose médiée par le RE. Nous avons donc focalisé nos recherches sur le rôle du choc thermique dans l'induction de l'apoptose via le RE.

Ainsi, nous avons commencé par étudier les protéines dont l'expression change lors de l'apoptose médiée par le RE. Les deux protéines étudiées sont la chaperonne Bip et le facteur de transcription CHOP. Une augmentation significative de leur niveau d'expression a été observée après trois heures de choc thermique. Nous avons également observé une augmentation de l'activité des caspase 4 et 12 et nous avons conclu que le choc thermique induit un stress du RE assez important pour induire une mort cellulaire par apoptose.

D'un autre côté, sous l'effet du choc thermique, l'homéostasie calcique est altérée lors d'une exposition des cellules au choc thermique, résultant en l'activation des cystéines protéases dépendantes du calcium (les calpaïnes) et leur translocation au niveau des membranes. L'utilisation des chélateurs de calcium (BAPTA et BAPTA-AM) a démontré l'importance du calcium à la fois intracellulaire et extracellulaire dans le déroulement du processus apoptotique, en particulier dans l'activation des calpaïnes, des caspases 12 et 4 ainsi que la chute du potentiel membranaire. Ces résultats sont également en accord avec d'autres études sur le rôle du calcium dans la régulation du processus apoptotique et fournissent davantage d'évidence en faveur de l'hypothèse que le mouvement de calcium du RE vers les mitochondries était un processus important dans l'induction de l'apoptose (Scorrano 2003; Scorrano and Korsmeyer 2003; Scorrano, Oakes et al. 2003) et l'activation des MAP kinases (Kim and Sharma 2004).

Sachant que la signalisation calcique contrôle différentes fonctions cellulaires incluant l'apoptose, il n'est donc pas surprenant que la famille Bcl-2 joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique. En effet, des études ont démontré que les protéines de la famille Bcl-2 insérée dans des couches bilipidiques du RE ou de la mitochondrie pouvait fonctionner comme un vrai canal ionique (Webster, Graham et al. 2006; Hanson, Bootman et al. 2008), et qu'elle pouvait à la fois modifier l'homéostasie calcique et avoir un rôle anti et pro-apoptotique (Lao and Chang 2007). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de deux membres de la famille Bcl-2, Puma et Noxa et leur translocation au niveau du RE. Nous avons également observé une baisse d'expression du taux de Bcl-2 et Bcl-xL au niveau des membranes du RE et de la mitochondrie. Le taux de Bak, Bax, Bik et Bim par contre, n'a pas augmenté dans le lysat cellulaire total, mais un changement de localisation a tout de même été observé : tous les quatre se sont relocalisés au niveau des membranes du RE et de la mitochondrie, à l'exception de Bim qui est transloqué uniquement au niveau de la mitochondrie. L'ensemble de ces analyses se résume en un « débalancement » du ratio des protéines pro/anti-apoptotiques au niveau des deux organelles, en faveur des BH3 pro-apoptotiques seulement. Les conséquences de tels événements sont néfastes pour la cellule et se traduisent par une perméabilisation des membranes du RE et de la mitochondrie de même qu'une libération des facteurs proapoptotiques qui y résident (calcium du RE et de la mitochondrie, cytochrome C et autres facteurs de la mitochondrie).

Par ailleurs, Il a été démontré qu'un stress du RE active la caspase 8 via la protéine Bap31 (Breckenridge, Nguyen et al. 2002). Cependant, l'inhibition de la voie du récepteur Fas inhibe complètement l'activité de la caspase 8, ce qui suggère que dans le cas du choc thermique, l'activation de la caspase 8 par le choc thermique est due uniquement à l'activation du récepteur de mort Fas.

La chute du potentiel membranaire, l'activation de la caspase 3 et la condensation de la chromatine en présence des chélateurs de calcium, même si c'est catégorique, nous permettent de déduire que premièrement, la chute du potentiel membranaire

n'est pas due uniquement à la translocation du calcium au niveau de la mitochondrie, et deuxièmement, que l'apoptose induite par le stress du RE n'est pas un facteur déterminant dans l'induction de l'apoptose par le choc thermique.

Sachant que les céramides et les ROS sont tous les deux impliqués dans le stress du RE, nous proposons l'hypothèse que le stress du RE est causé, au moins en partie, par l'accumulation de céramides. Tout récemment, une publication est parue dans la revue «Biochemistry» sur le rôle de céramides dans l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique via l'hydrolyse de sphingomyélines par les sphingomyélinases (Lei, Zhang et al. 2007). Comme mentionné ci-dessus, les céramides peuvent s'accumuler au niveau du RE (Michel and van Echten-Deckert 1997) et par conséquent générer un stress du RE. Une étude très récente publiée dans la revue «Blood» a montré qu'à des fortes concentrations les céramides induisent une augmentation de l'expression des protéines du stress du RE (Bip et CHOP) ainsi que l'activation de la caspase 4 et de la protéine kinase PERK (Lee, Torchalski et al. 2007; Chen, Lin et al. 2008). Dans la même étude les auteurs montrent que l'induction de l'apoptose par les céramides fait intervenir également les protéines p38 et ASK-1. D'un autre côté, le facteur de transcription CHOP, peu ou non exprimé dans les conditions physiologiques normales; est connu pour inhiber l'expression de Bcl-2 et augmente la production des ROS (McCullough, Martindale et al. 2001). La réalisation d'expériences supplémentaires comme l'inhibition de la génération de ROS et des céramides pourrait probablement confirmer leur implication dans l'induction de l'apoptose par le choc thermique via le RE.

6-Mécanismes de toxicité du choc thermique : induction d'un stress du noyau:

L'augmentation importante de l'activité de la caspase 2 (localisée majoritairement au niveau du noyau), observée après 2h de traitement au choc thermique pourrait ouvrir de nouvelles perspectives à notre compréhension du mécanisme de toxicité du

choc thermique. Le clivage de Bid et sa translocation vers la mitochondrie surviennent également après deux heures de choc thermique. Plusieurs hypothèses concernant l'activation de la caspase 2 et le clivage de Bid ont été avancées et elles convergent toutes vers un stress du noyau. De plus, il a été démontré que l'hyperthermie (40-46°C) cause une agrégation des protéines au niveau du noyau ce qui résulte en un stress du noyau (Lepock 2004; Roti Roti 2008). Ces altérations nucléaires conduisent à la libération de molécules apoptogéniques présentes dans le noyau (Kouroku, Fujita et al. 2000). D'autre part, le noyau est également un lieu de stockage du calcium (Ledein and Wu 2007). Le stress du noyau peut engendrer une perte de l'homéostasie calcique, une activation des endo-nucléases, calcium-dépendante et d'autres facteurs pro-apoptotiques localisés au niveau du noyau et que faute de temps, nous n'étions pas capables d'investiguer ces hypothèses qui représentent les perspectives des prochaines études à venir dans le laboratoire.

7- Effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C contre l'induction de l'apoptose par le choc thermique:

L'autre objectif de la présente étude consistait à investiguer le rôle de la thermotolérance dans l'inhibition de l'induction de l'apoptose par le choc thermique. L'effet protecteur est évident puisque nous avons démontré que la thermotolérance protège contre les événements tardifs de l'apoptose. Cependant, les questions auxquelles nous devons répondre sont :

- 1- La thermotolérance inhibe-t-elle l'activation de la voie du récepteur de mort fas par le choc thermique ?
- 2- La thermotolérance inhibe-t-elle l'activation des MAP kinases et de la p53?
- 3- A quel niveau de la cascade apoptotique la thermotolérance exerce-t-elle son effet protecteur?

7-1. La thermotolérance protège contre l'induction de la voie du récepteur de mort Fas par le choc thermique :

Notre étude a permis de conclure que la translocation de FADD au niveau de la membrane plasmique, le clivage de la caspase 8 et l'activation de celle-ci ont été régulés à la baisse dans des cellules rendues thermotolérantes à 40°C. De plus, dans tous les autres événements qui surviennent après la formation de DISC, nous avons observé un effet protecteur. Ceci suggère que la thermotolérance prévient les mécanismes d'induction de l'apoptose à un stade hâtif. Toutefois, il est admis que suite à un choc thermique, certaines protéines du choc thermique subissent un changement de localisation cellulaire. La HSP27, par exemple, est relocalisée au niveau du noyau et aux membranes plasmiques, ce qui pourrait expliquer la réduction du taux d'activation du récepteur Fas. Des études récentes ont montré que HSP90, HSP70 et HSP27 peuvent jouer un rôle d'inhibiteur de l'induction de la voie du récepteur de mort Fas par différents stress (Mehlen, Schulze-Osthoff et al. 1996; Garrido, Ottavi et al. 1997). Cependant les mécanismes impliqués ne sont malheureusement pas assez détaillés pour confirmer un rôle direct.

De même, l'induction de la thermotolérance à 40°C a permis de conférer aux cellules un effet de protection contre la stimulation de la voie mitochondriale par un choc thermique subséquent sévère. Les effets protecteurs de la thermotolérance ont été observés, aussi bien durant les événements précoces de l'apoptose (comme la translocation de Bax et le relâchement du cytochrome c), que durant les événements tardifs (clivage de PARP et ICAD, condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN). Ces résultats semblent confirmer des travaux précédents effectués par d'autres équipes de recherches et affirmant que les HSPs, notamment la HSP27 et la HSP70 préviennent le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase 9 (Beere, Wolf et al. 2000; Bruey, Ducasse et al. 2000; Klein and Brune 2002). D'autres études ont démontré le rôle des HSPs dans l'inhibition de l'activation des caspases en interagissant avec l'apoptosome et/ou la protéine AIF (Ruchalski, Mao et

al. 2003; Matsumori, Hong et al. 2005). La HSP70, par exemple est l'une des principales protéines régulatrices de l'AIF (Ravagnan, Gurbuxani et al. 2001). L'action d'HSP 70 sur l'apoptose s'explique également par l'inhibition de la formation de l'apoptosome puisque HSP 70 se lie à Apaf-1. D'un autre côté, Zhao et Wang ont montré que la HSP 90 peut inhiber l'induction de l'apoptose par la voie de TNF- α en prévenant le clivage de Bid (Zhao and Wang 2004). Selon, Bellyei et ses collaborateurs la surexpression de la HSP 16.2 ($\alpha\beta$ -crystalline) protège contre la toxicité du taxol et du peroxyde d'hydrogène. Ses effets protecteurs se manifestent par le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, la stabilisation des radeaux lipidiques, l'activation de la voie de survie Akt via la HSP 90 (Bellyei, Szigeti et al. 2007).

7-2. La thermotolérance protège contre l'activation des MAP kinases par le choc thermique :

Par ailleurs, l'activation des protéines MAP kinases est également un élément indispensable pour l'activation de certaines protéines de choc thermique (Kozawa and Tokuda 2002). La HSP 27 est, par exemple, activée par la p38 (Zhang, Zhang et al. 2005). L'inhibition de la p38 résulte en l'inhibition de l'effet protecteur de la HSP27 et rend les cardiomyocytes vulnérables à la toxicité de la thrombine (Tanabe, Akamatsu et al. 2005). En revanche, d'autres études montrent également que les HSPs régulent l'activité de certaines MAP kinases. Il a été démontré que la voie PI3K/Akt contribuait à la stabilisation de HIF-1 α en induisant l'expression des HSPs (Hellwig-Burgel, Stiehl et al. 2005; Louapre, Grongnet et al. 2005). Prises dans leur ensemble, ces trouvailles proposent des explications à l'effet protecteur de la thermotolérance contre l'induction de la voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose.

7-3. La thermotolérance protège contre l'induction de l'apoptose via la voie du RE :

Le rôle de la thermotolérance est également évident dans toutes les étapes de transduction du signal apoptotique via la voie du RE. Cependant, peu d'études ont étudié le rôle de la thermotolérance ou des protéines du choc thermique dans la protection contre un stress du RE. Stege et ses collaborateurs ont démontré que la thermotolérance protège les cellules HeLa contre l'agrégation nucléaires des protéines sous l'effet du choc thermique. De plus, il a été reporté que la protéine HSP27 interagit avec le facteur EIF4G lors d'un choc thermique ou un stress oxydatif et participe à l'arrêt de la synthèse protéique, ce qui réduit le risque de toxicité dû à l'accumulation de protéines à conformations anormales (Cuesta, Laroia et al. 2000). Il s'agit de la première étude effectuée *in vitro* dans le but de montrer le rôle protecteur de la thermotolérance induite à un choc thermique doux contre l'induction l'apoptose via la voie du RE. Cependant, des études plus poussées sur le rôle exact de chacune de protéines HSPs devraient être réalisées pour clarifier leur implication dans l'effet protecteur de la thermotolérance.

7-4. La thermotolérance protège contre la génération des Radicaux libres :

Nos résultats montrent que chez des cellules HeLa rendues thermotolérantes à 40°C, la génération des radicaux libres par le choc thermique est régulée à la baisse. Cet effet pourrait être dû au rôle protecteur des HSPs puisque plusieurs études ont montré que les HSPs diminuent le niveau basal des ROS chez des cellules à l'état normal et réduisent le taux de ROS générés dans le cas de stress (Mehlen, Preville et al. 1995; Mehlen, Schulze-Osthoff et al. 1996; Garrido, Ottavi et al. 1997). Cela a pour effet : la diminution du taux la lipoperoxydation membranaire et le taux d'activation de NFκB (Mehlen, Preville et al. 1995). Les HSPs sont également connues pour moduler le métabolisme du glutathion. La HSP 27, par exemple, favorise l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion entre

autres ; la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la glutathion transférase ce qui augmente le rapport GSH/GSSG et réduit le stress oxydatif.

Finalement, alors que le niveau d'expression des protéines du choc thermique chez des cellules tumorales pourrait être plus élevé que chez des cellules normales, ce qui pourrait absorber et anéantir les effets d'un traitement de la tumeur par la chimiothérapie ou la radiothérapie selon plusieurs études (Hermisson and Weller 2000; Ciocca and Calderwood 2005; Romanucci, Marinelli et al. 2006), Il est intéressant de noter que les cellules tumorales HeLa sont sensibles au choc thermique et qu'après trois heures à 43°C, au moins 60% des cellules sont mortes par apoptose et que le taux de nécrose demeure relativement faible. Cependant l'augmentation du taux d'expression des HSPs suite à l'acquisition du phénomène de thermotolérance, pourrait anéantir au traitement à l'hyperthermie si survenu dans les cellules tumorales.

Les traitements biologiques du cancer sont connus pour stimuler la réponse du système immunitaire et pour cibler spécifiquement l'organe atteint. Les effets secondaires sont généralement légers, comme il en est de même pour l'hyperthermie. Celle-ci pourrait servir comme traitement biologique localisé ou généralisé sans effets secondaires qui peut être combiné aux méthodes classiques de traitement du cancer. De ce faite, elle pourrait améliorer l'efficacité des autres possibilités thérapeutiques, puisqu'elle est capable d'induire dans un temps relativement court la mort d'un pourcentage élevé de cellules tumorales par apoptose et à un taux moindre par nécrose. Cependant, il est nécessaire d'éviter de développer un état de thermotolérance qui protégera les contre la toxicité des autres traitements.

Figure 10.1: Test de cytotoxicité: des cellules HeLa(A), CHO (B), T24 (C) et A549 (D) thermotolérantes et non thermotolérantes ont été exposées au choc thermique (43°C) pendant différentes périodes de temps dans du D-mem contenant 10% de sérum. Après l'incubation, un volume contenant 400 cellules a été prélevées et ensemençé dans des pétris de 60mm² contenant 5ml de D-mem et 10% de sérum. Les cellules ayant survécues au stress se déposent et forment des colonies. Le nombre de colonies a été compté après coloration au bleu de mythélène et exprimé par rapport au contrôle.

Figure 10.2: Le choc thermique induit la condensation de la chromatine : La condensation de la chromatine a été détectée à l'aide de la méthode de Hoechst 32558. Des cellules HeLa (A1-4), CHO (B1-4) T24 (C1-4) et A549 (D1-4) thermotolérantes (3-4) ou non (1-2). Ont été exposées pendant deux heures à 43°C, puis marquée pendant 20min avec du Hoechst 32558 (50µg/ml). Avant observation au microscope 50µg d'iodure de propodium ont été ajouté. Au moins 200 cellules ont été observées (X40) pour chacune des images. Le nombre de cellules apoptotique (bleues) et nécrotiques (rouge) a été compté et exprimé par rapport au contrôle (37°C).

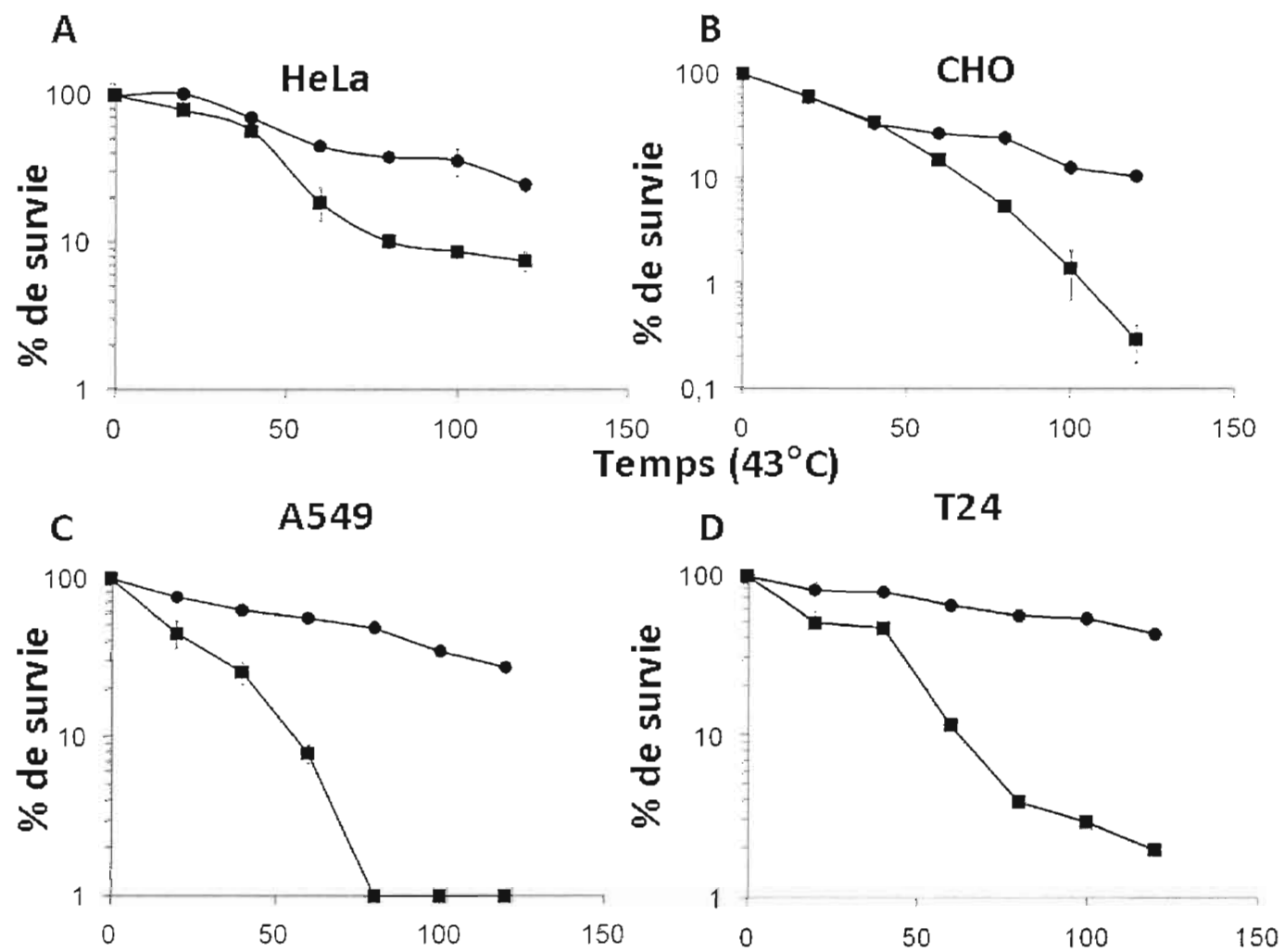


Figure 1A-D

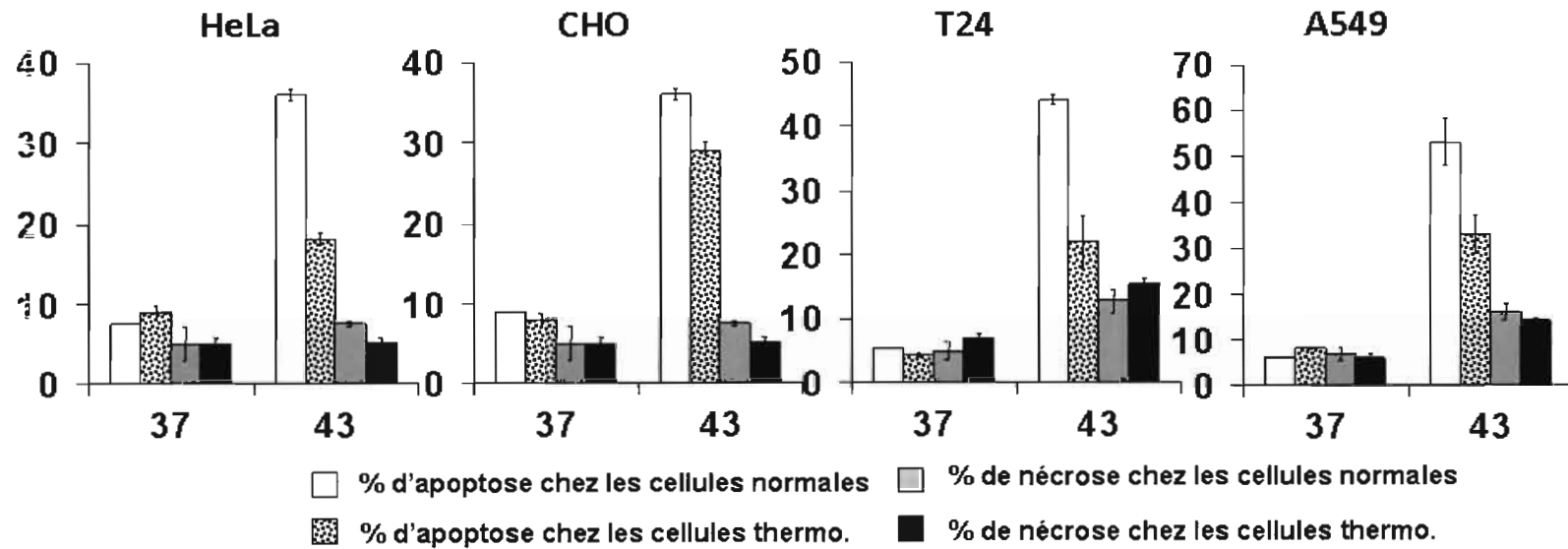
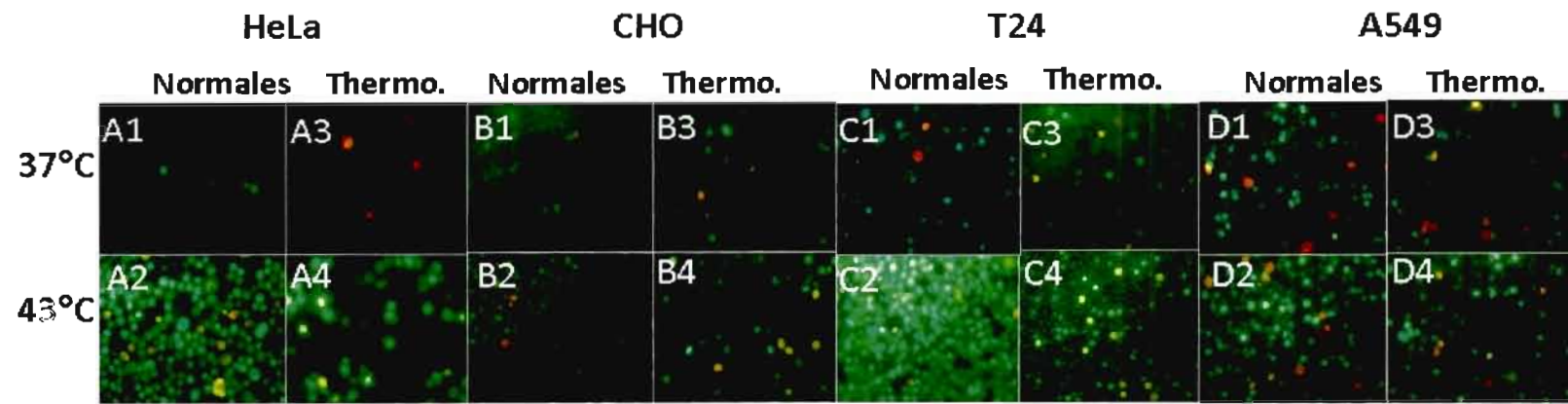
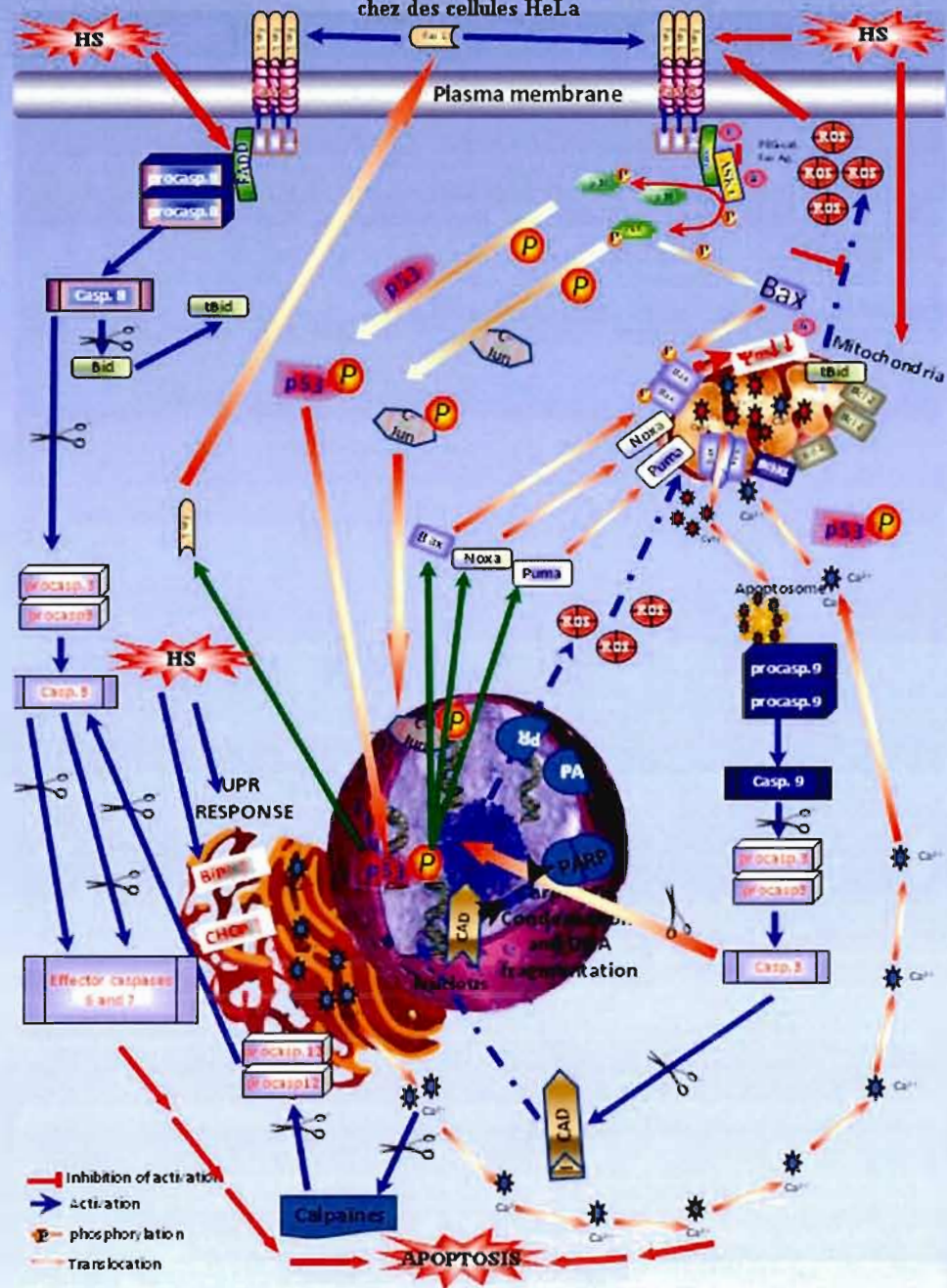


Figure 1A-D

Figure 10.3: Mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose par le choc thermique chez des cellules HeLa



RÉFÉRENCES

- Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson et M. R. Rosner. 1999. «Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth». *Mol Cell Biol.* vol. 19, no 2, p. 1301-1312. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9891064>.
- Abe, M. K., M. P. Saelzler, R. Espinosa, 3rd, K. T. Kahle, M. B. Hershenson, M. M. Le Beau et M. R. Rosner. 2002. «ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family». *J Biol Chem.* vol. 277, no 19, p. 16733-16743. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11875070>.
- Abraham, M. C., et S. Shaham. 2004. «Death without caspases, caspases without death». *Trends Cell Biol.* vol. 14, no 4, p. 184-193. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15066636>.
- Adams, D. G., N. A. Sachs et R. R. Vaillancourt. 2002. «Phosphorylation of the stress-activated protein kinase, MEKK3, at serine 166». *Arch Biochem Biophys.* vol. 407, no 1, p. 103-116. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12392720>.
- Adams, J. P., et J. D. Sweatt. 2002. «Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory». *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* vol. 42, p. 135-163. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11807168>.
- Adderley, S. R., et D. J. Fitzgerald. 1999. «Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2». *J Biol Chem.* vol. 274, no 8, p. 5038-5046. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9988750>.
- Adler, V., A. Schaffer, J. Kim, L. Dolan et Z. Ronai. 1995. «UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways». *J Biol Chem.* vol. 270, no 44, p. 26071-26077. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7592807>.
- Ahmed, M. M., S. F. Sells, K. Venkatasubbarao, S. M. Fruitwala, S. Muthukkumar, C. Harp, M. Mohiuddin et V. M. Rangnekar. 1997. «Ionizing radiation-inducible apoptosis in the

absence of p53 linked to transcription factor EGR-1». *J Biol Chem.* vol. 272, no 52, p. 33056-33061. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9407088>.

Akanmu, A. S. 2006. «AIDS-associated malignancies». *Afr J Med Med Sci.* vol. 35 Suppl, p. 57-70. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18050776>.

Alessenko, A., et S. Chatterjee. 1995. «Neutral sphingomyelinase: localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation». *Mol Cell Biochem.* vol. 143, no 2, p. 169-174. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7596351>.

Alonso, G., C. Ambrosino, M. Jones et A. R. Nebreda. 2000. «Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength». *J Biol Chem.* vol. 275, no 51, p. 40641-40648. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11010976>.

Anderson, C. N., et A. M. Tolkovsky. 1999. «A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside». *J Neurosci.* vol. 19, no 2, p. 664-673. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9880587>.

Angeletti, P. C., L. Zhang et C. Wood. 2008. «The viral etiology of AIDS-associated malignancies». *Adv Pharmacol.* vol. 56, p. 509-557. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18086422>.

Aoki, K. 2003. «[Chronic bacterial infections and cancer--from the viewpoint of the epidemiology and biological evidences]». *Nippon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology.* vol. 58, no 4, p. 603-618.

Arai, Y., T. Kondo, K. Tanabe, Q. L. Zhao, F. J. Li, R. Ogawa, M. Li et M. Kasuya. 2002. «Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells». *J Biol Chem.* vol. 277, no 21, p. 18986-18993. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11861640>.

Arechiga, C. F., A. D. Ealy et P. J. Hansen. 1995. «Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos». *Biol Reprod.* vol. 52, no 6, p. 1296-1301. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7632838>.

Ares. 1974. *Ancient Egyptian medicine : the Papyrus Ebers*. Chicago: Ares Publishers.

Arrigo, A. P. 2005. «[Heat shock proteins as molecular chaperones]». *Med Sci (Paris)*. vol. 21, no 6-7, p. 619-625. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15985205>.

-----, 2007. «The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis». *Adv Exp Med Biol*. vol. 594, p. 14-26. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17205671>.

Arrigo, A. P., S. Simon, B. Gibert, C. Kretz-Remy, M. Nivon, A. Czekalla, D. Guillet, M. Moulin, C. Diaz-Latoud et P. Vicart. 2007. «Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets». *FEBS Lett*. vol. 581, no 19, p. 3665-3674. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17467701>.

Arthur B Pardee, Gary S Stein. 2008. *The Biology and Treatment of Cancer Understanding Cancer*: Wiley-Liss.

Arya, R., M. Mallik et S. C. Lakhota. 2007. «Heat shock genes - integrating cell survival and death». *J Biosci*. vol. 32, no 3, p. 595-610. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17536179>.

Asea, A. 2008. «Heat shock proteins and toll-like receptors». *Handb Exp Pharmacol*, no 183, p. 111-127. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18071657>.

Auckland. 2008. «Surgery + adjuvant therapy beneficial for cervical cancer». *Inpharma weekly*, no 1623, p. 3.

Auerbach, Mitchel D. 1955. *A new concept of cancer, with a brief history of changing cancer thought through the ages*. New York: Pageant Press.

August, D. A., P. H. Sugarbaker et P. D. Schneider. 1985. «Lymphatic dissemination of hepatic metastases. Implications for the follow-up and treatment of patients with colorectal cancer». *Cancer*. vol. 55, no 7, p. 1490-1494.

Averill-Bates, D. A., A. Cherif, E. Agostinelli, A. Tanel et G. Fortier. 2005. «Anti-tumoral

effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model». *Biochem Pharmacol.* vol. 69, no 12, p. 1693-1704. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15935145 >.

Axon, A. T. 2007. «Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion». *Adv Med Sci.* vol. 52, p. 55-60. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18217390 >.

Aylon, Y., et M. Oren. 2007. «Living with p53, dying of p53». *Cell.* vol. 130, no 4, p. 597-600. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17719538 >.

Azria, D., C. Lemanski, A. Zouhair, M. Gutowski, Y. Belkacemi, J. B. Dubois, G. Romieu et M. Ozsahin. 2004. «Adjuvant treatment of breast cancer by concomitant hormonotherapy and radiotherapy: state of the art». *CANCER RADIOTHERAPIE.* vol. 8, no 3, p. 188-196.

Babbs, C. F., et D. P. DeWitt. 1981. «Physical principles of local heat therapy for cancer». *Med Instrum.* vol. 15, no 6, p. 367-373. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7339466 >.

Bagley, K. C. 2008. «Genetic adjuvant therapy for pancreatic cancer and other solid tumours». *Gut : journal of the British Society of Gastroenterology.* vol. 57, no 3, p. 289-291.

Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis et R. A. Cerione. 1995. «Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation». *J Biol Chem.* vol. 270, no 47, p. 27995-27998. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7499279 >.

Ballou, L. R., S. J. Lauderkind, E. F. Rosloniec et R. Raghoebar. 1996. «Ceramide signalling and the immune response». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1301, no 3, p. 273-287. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8664339 >.

Banki, K., E. Hutter, N. J. Gonchoroff et A. Perl. 1999. «Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling». *J Immunol.* vol. 162, no 3, p. 1466-1479. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973403 >.

Bao, Q., et Y. Shi. 2007. «Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases».

Cell Death Differ. vol. 14, no 1, p. 56-65. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16977332>.

Barinaga, M. 1997. «Designing therapies that target tumor blood vessels». *Science (New York, N.Y.)*. vol. 275, no 5299, p. 482-484.

Barone, M. V., A. Crozat, A. Tabaee, L. Philipson et D. Ron. 1994. «CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest». *Genes Dev.* vol. 8, no 4, p. 453-464. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8125258>.

Baronzio, G., A. Gramaglia et G. Fiorentini. 2006. «Hyperthermia and immunity. A brief overview». *In Vivo*. vol. 20, no 6A, p. 689-695. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17203747>.

Barron, Rachel. 2004. *Richard Nixon : American politician*. Coll. «[Twentieth century leaders]». Greensboro, N.C.: Morgan Reynolds.

Basile, Antonio, Daniela Biziato, Gajanan V. Sherbet, Paola Comi et Francesco Cajone. 2008. «Hyperthermia inhibits cell proliferation and induces apoptosis: Relative signaling status of P53, S100A4, and Notch in heat sensitive and resistant cell lines». *Journal of cellular biochemistry*. vol. 103, no 1, p. 212.

Bassik, M. C., L. Scorrano, S. A. Oakes, T. Pozzan et S. J. Korsmeyer. 2004.

«Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis». *Embo J.* vol. 23, no 5, p. 1207-1216. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15010700>.

Basso, A. D., D. B. Solit, G. Chiosis, B. Giri, P. Tsichlis et N. Rosen. 2002. «Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function». *J Biol Chem*. vol. 277, no 42, p. 39858-39866. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12176997>.

Bates, J. H., E. Przybytkowski, D. A. Bates et W. J. Mackillop. 1986. «A model-free way of representing hyperthermia cell survival data». *Radiat Res*. vol. 107, no 3, p. 307-316. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3749465>.

Bauer, V., et F. Bauer. 1999. «Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury». *Gen Physiol Biophys*. vol. 18 Spec No, p. 7-14. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10703713>.

Bauer, V., R. Sotnikova, J. Machova, S. Matyas, V. Pucovsky et M. Stefek. 1999. «Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine, vessels and airways and the effect of antioxidants». *Life Sci.* vol. 65, no 18-19, p. 1909-1917. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10576436>.

Beck, S. C., et A. De Maio. 1994. «Stabilization of protein synthesis in thermotolerant cells during heat shock. Association of heat shock protein-72 with ribosomal subunits of polysomes». *J Biol Chem.* vol. 269, no 34, p. 21803-21811. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8063823>.

Beere, H. M. 2001. «Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins». *Sci STKE.* vol. 2001, no 93, p. RE1. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11752668>.

Beere, H. M., et D. R. Green. 2001. «Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis». *Trends Cell Biol.* vol. 11, no 1, p. 6-10. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11146277>.

Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen et D. R. Green. 2000. «Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 8, p. 469-475. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10934466>.

Beere, H. M. Helen M. Beere. 2005. «Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways». *J Clin Invest.* vol. 115, no 10, p. 2633-2639. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16200196>.

Beliveau, R., et D. Gingras. 2007. «Role of nutrition in preventing cancer». *Can Fam Physician.* vol. 53, no 11, p. 1905-1911. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000267>.

Bellyei, S., A. Szigeti, A. Boronkai, E. Pozsgai, E. Gomori, B. Melegh, T. Janaky, Z. Bogнар, E. Hocsak, B. Sumegi et F. Gallyas, Jr. 2007. «Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt

activation pathway». *Apoptosis*. vol. 12, no 1, p. 97-112. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17136496>.

Belpomme, D., P. Irigaray, L. Hardell, R. Clapp, L. Montagnier, S. Epstein et A. J. Sasco.

2007. «The multitude and diversity of environmental carcinogens». *Environ Res*. vol. 105, no 3, p. 414-429. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17692309>.

Benailly, M., O. Schweisguth et J. C. Job. 1975. «[Corticosuprarenaloma in children]». *Arch Fr Pediatr*. vol. 32, no 5, p. 441-453. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=127562>.

Bernales, S., F. R. Papa et P. Walter. 2006. «Intracellular signaling by the unfolded protein response». *Annu Rev Cell Dev Biol*. vol. 22, p. 487-508. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16822172>.

Bernardi, P., et A. Rasola. 2007. «Calcium and cell death: the mitochondrial connection».

Subcell Biochem. vol. 45, p. 481-506. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18193649>.

Bernardini, C., A. Zannoni, M. E. Turba, P. Fantinati, C. Tamanini, M. L. Bacci et M. Forni.

2005. «Heat shock protein 70, heat shock protein 32, and vascular endothelial growth factor production and their effects on lipopolysaccharide-induced apoptosis in porcine aortic endothelial cells». *Cell Stress Chaperones*. vol. 10, no 4, p. 340-348. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16333987>.

Bershtein, L., T. Poroshina, T. Zimarina, E. Tsyrlina, E. Zhil'tsova, A. Kovalevskii et V.

Semiglazov. 2004. «Expression of estrogen receptors- α and β , in primary breast neoplasms and tumors exposed to neoadjuvant hormonal therapy». *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. vol. 138, no 5, p. 494-496.

Berstein, Lev M., et Richard J. Santen. 2008. *Innovative endocrinology of cancer*. Coll.

«Advances in experimental medicine and biology, v. 630». New York; Austin, Tex.: Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience.

Bettaieb, A., et D. A. Averill-Bates. 2005. «Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis». *J Cell Physiol*. vol. 205, no 1, p. 47-57. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15887240>.

-----, 2008. «Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling». *Biochem Cell Biol.* vol. 86, no 6, p. 521-538. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19088800.

Bevers, E. M., P. Comfurius, D. W. Dekkers et R. F. Zwaal. 1999. «Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1439, no 3, p. 317-330. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446420 >.

Bhandari, M. S., A. Mazumder et D. H. Vesole. 2007. «Liver involvement in multiple myeloma». *Clin Lymphoma Myeloma.* vol. 7, no 8, p. 538-540. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18021472 >.

Bhattacharyya, A., S. Pathak, C. Basak, S. Law, M. Kundu et J. Basu. 2003. «Execution of macrophage apoptosis by Mycobacterium avium through apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling and caspase 8 activation». *J Biol Chem.* vol. 278, no 29, p. 26517-26525. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12724324 >.

Bicknell, G. R., et G. M. Cohen. 1995. «Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 207, no 1, p. 40-47. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7857295 >.

Bidwell, G. L., 3rd, A. N. Davis, I. Fokt, W. Priebe et D. Raucher. 2007. «A thermally targeted elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate overcomes drug resistance». *Invest New Drugs.* vol. 25, no 4, p. 313-326. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17483874 >.

Biggs, J. R., N. G. Ahn et A. S. Kraft. 1998. «Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in U937 leukemic cells induces phosphorylation of the amino terminus of the TATA-binding protein». *Cell Growth Differ.* vol. 9, no 8, p. 667-676. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9716183 >.

Bilsky, M. H., P. Gerszten, I. Laufer et Y. Yamada. 2008. «Radiation for primary spine tumors». *Neurosurg Clin N Am.* vol. 19, no 1, p. 119-123. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>

&list_uids=18156054 >.

BioMed Central, Ltd. «Infectious agents and cancer». BioMed Central. En ligne.
<<http://www.infectagentscancer.com/>>.

Birbes, H., S. El Bawab, Y. A. Hannun et L. M. Obeid. 2001. «Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis». *Faseb J.* vol. 15, no 14, p. 2669-2679. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11726543>.

Biswas, S., F. Harris, S. Dennison, J. P. Singh et D. Phoenix. 2005. «Calpains: enzymes of vision?». *Med Sci Monit.* vol. 11, no 9, p. RA301-310. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16127377>.

Biswas, S. C., et L. A. Greene. 2002. «Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation». *J Biol Chem.* vol. 277, no 51, p. 49511-49516. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12388545>.

Bitar, K. N. 2002. «HSP27 phosphorylation and interaction with actin-myosin in smooth muscle contraction». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* vol. 282, no 5, p. G894-903. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11960785>.

Bjorkdahl, C., M. J. Sjogren, X. Zhou, H. Concha, J. Avila, B. Winblad et J. J. Pei. 2007. «Small heat shock proteins Hsp27 or alphaB-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: Tau and neurofilaments». *J Neurosci Res.* En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18061943>.

Blanchard, H., P. Grochulski, Y. Li, J. S. Arthur, P. L. Davies, J. S. Elce et M. Cygler. 1997. «Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes». *Nat Struct Biol.* vol. 4, no 7, p. 532-538. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9228945>.

Blanchard, H., Y. Li, M. Cygler, C. M. Kay, J. Simon, C. Arthur, P. L. Davies et J. S. Elce. 1996. «Ca(2+)-binding domain VI of rat calpain is a homodimer in solution: hydrodynamic, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies». *Protein Sci.* vol. 5, no 3, p. 535-537. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8868491>.

Bogoyevitch, M. A., et N. W. Court. 2004. «Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8». *Cell Signal.* vol. 16, no 12, p. 1345-1354. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15381250>.

Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu et M. E. Greenberg. 1999. «Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms». *Science.* vol. 286, no 5443, p. 1358-1362. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10558990>.

Bonny, C., P. Nicod et G. Waeber. 1998. «IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells». *J Biol Chem.* vol. 273, no 4, p. 1843-1846. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9442013>.

Bonzon, C., L. Bouchier-Hayes, L. J. Pagliari, D. R. Green et D. D. Newmeyer. 2006. «Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death». *Mol Biol Cell.* vol. 17, no 5, p. 2150-2157. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16495337>.

Bootman, M. D., D. Thomas, S. C. Tovey, M. J. Berridge et P. Lipp. 2000. «Nuclear calcium signalling». *Cell Mol Life Sci.* vol. 57, no 3, p. 371-378. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10823238>.

Boppart, M. D., S. Asp, J. F. Wojtaszewski, R. A. Fielding, T. Mohr et L. J. Goodyear. 2000. «Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle». *J Physiol.* vol. 526 Pt 3, p. 663-669. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10922016>.

Boreham, D. R., J. A. Dolling, S. R. Maves, S. Miller, D. P. Morrison et R. E. Mitchel. 1997. «Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes». *Biochem Cell Biol.* vol. 75, no 4, p. 393-397. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9493962>.

Borrelli, M. J., R. S. Wong et W. C. Dewey. 1986. «A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G1 CHO cells». *J Cell Physiol.* vol. 126, no 2, p. 181-190. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3944204>.

Borsch-Haubold, A. G., S. Pasquet et S. P. Watson. 1998. «Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase». *J Biol Chem.* vol. 273, no 44, p. 28766-28772. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9786874>.

Borsello, T., et G. Forloni. 2007. «JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration». *Curr Pharm Des.* vol. 13, no 18, p. 1875-1886. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17584114>.

Bortner, C. D., et J. A. Cidlowski. 2007. «Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis». *Arch Biochem Biophys.* vol. 462, no 2, p. 176-188. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17321483>.

Borugian, M. J., S. B. Sheps, C. Kim-Sing, I. A. Olivotto, C. Van Patten, B. P. Dunn, A. J. Coldman, J. D. Potter, R. P. Gallagher et T. G. Hislop. 2003. «Waist-to-hip ratio and breast cancer mortality». *Am J Epidemiol.* vol. 158, no 10, p. 963-968. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14607804>.

Bose, I., et B. Ghosh. 2007. «The p53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis». *J Biosci.* vol. 32, no 5, p. 991-997. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17914240>.

Bose, R., M. Verheij, A. Haimovitz-Friedman, K. Scotto, Z. Fuks et R. Kolesnick. 1995. «Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals». *Cell.* vol. 82, no 3, p. 405-414. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7634330>.

Bost, F., R. McKay, N. Dean et D. Mercola. 1997. «The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells». *J Biol Chem.* vol. 272, no 52, p. 33422-33429. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9407138>.

Bouhon, I. A., M. Shinkai, H. Honda, M. Mizuno, T. Wakabayashi, J. Yoshida et T. Kobayashi. 1999. «Synergism between mild hyperthermia and interferon-beta gene expression». *Cancer Lett.* vol. 139, no 2, p. 153-158. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10395172>.

Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R.

A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb et G. D. Yancopoulos. 1991. «ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF». *Cell*. vol. 65, no 4, p. 663-675. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2032290>.

Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem*. vol. 72, p. 248-254. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=942051>.

Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J. J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R. A. Flavell et R. J. Davis. 2003. «Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo». *Genes Dev*. vol. 17, no 16, p. 1969-1978. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12893778>.

Breckenridge, D. G., M. Nguyen, S. Kuppig, M. Reth et G. C. Shore. 2002. «The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum». *Proc Natl Acad Sci US A*. vol. 99, no 7, p. 4331-4336. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11917123>.

Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, R. C. Marcellus et G. C. Shore. 2003. «Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol». *J Cell Biol*. vol. 160, no 7, p. 1115-1127. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12668660>.

Bredesen, D. E. 2007. «Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs». *Stroke*. vol. 38, no 2 Suppl, p. 652-660. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17261709>.

Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter et M. C. Gustin. 1993. «An osmosensing signal transduction pathway in yeast». *Science*. vol. 259, no 5102, p. 1760-1763. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7681220>.

Brostrom, C. O., et M. A. Brostrom. 1990. «Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells». *Annu Rev Physiol*. vol. 52, p. 577-590. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2184768>.

Bruey, J. M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S. A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A. P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary et C. Garrido. 2000. «Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 9, p. 645-652. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10980706>.

Bruning, Nancy. 1985. *Coping with chemotherapy*. Garden City, N.Y.: Dial Press.

Bump, N. J., M. Hackett, M. Hugunin, S. Seshagiri, K. Brady, P. Chen, C. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, P. Li et al. 1995. «Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35». *Science*. vol. 269, no 5232, p. 1885-1888. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7569933>.

Burdon, R. H. 1995. «Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation». *Free Radic Biol Med.* vol. 18, no 4, p. 775-794. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7750801>.

Burdon, R. H., D. Alliangana et V. Gill. 1994. «Endogenously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-21 cell proliferation». *Free Radic Res.* vol. 21, no 3, p. 121-133. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7981784>.

Burgman, P., H. Ouyang, S. Peterson, D. J. Chen et G. C. Li. 1997. «Heat inactivation of Ku autoantigen: possible role in hyperthermic radiosensitization». *Cancer Res.* vol. 57, no 14, p. 2847-2850. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9230187>.

Bursch, W., et A. Ellinger. 2005. «Autophagy--a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration». *Folia Neuropathol.* vol. 43, no 4, p. 297-310. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16416394>.

Buzzard, K. A., A. J. Giaccia, M. Killender et R. L. Anderson. 1998. «Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 273, no 27, p. 17147-17153. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9642282>.

Cai, J., et D. P. Jones. 1999. «Mitochondrial redox signaling during apoptosis». *J Bioenerg Biomembr.* vol. 31, no 4, p. 327-334. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10665523>.

Calabro, V., G. Mansueto, T. Parisi, M. Vivo, R. A. Calogero et G. La Mantia. 2002. «The human MDM2 oncoprotein increases the transcriptional activity and the protein level of the p53 homolog p63». *J Biol Chem.* vol. 277, no 4, p. 2674-2681. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11714701>.

Calderwood, S. K., et D. R. Ciocca. 2008. «Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer». *Int J Hyperthermia.* vol. 24, no 1, p. 31-39. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18214767>.

Calderwood, S. K., M. A. Khaleque, D. B. Sawyer et D. R. Ciocca. 2006. «Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis». *Trends Biochem Sci.* vol. 31, no 3, p. 164-172. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16483782>.

Calderwood, S. K., S. S. Mambula et P. J. Gray, Jr. 2007. «Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 1113, p. 28-39. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17978280>.

Calle, Eugenia E. 2007. «Obesity and cancer». *BMJ : British medical journal* /. vol. 335, no 7630, p. 1107.

Calle, E. E., C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond et M. J. Thun. 2003. «Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults». *N Engl J Med.* vol. 348, no 17, p. 1625-1638. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12711737>.

Calo, L. A., P. A. Davis, A. Piccoli et A. C. Pessina. 2006. «A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story?». *Nephron Physiol.* vol. 103, no 3, p. p107-111. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16554668>.

Cameron, S., L. Levin, M. Zoller et M. Wigler. 1988. «cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*». *Cell.* vol. 53, no 4, p. 555-566. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2836063>.

Campanella, M., P. Pinton et R. Rizzuto. 2004. «Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in health and disease». *Biol Res.* vol. 37, no 4, p. 653-660. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15709694>.

Campanella, M., G. Szabadkai et R. Rizzuto. 2008. «Modulation of intracellular Ca^{2+} signalling in HeLa cells by the apoptotic cell death enhancer PK11195». *Biochem Pharmacol.* vol. 76, no 11, p. 1628-1636. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18929543>.

Canadian Cancer society, PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. 2008. «Canadian Cancer Statistics 2007». *Canadian Cancer publications* vol. 2007.

Carafoli, E. 2002. «Calcium signaling: a tale for all seasons». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 99, no 3, p. 1115-1122. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11830654>.

Cardone, M. H., G. S. Salvesen, C. Widmann, G. Johnson et S. M. Frisch. 1997. «The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases». *Cell.* vol. 90, no 2, p. 315-323. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9244305>.

Carragher, N. O., B. Levkau, R. Ross et E. W. Raines. 1999. «Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin». *J Cell Biol.* vol. 147, no 3, p. 619-630. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10545505>.

Casado, P., P. Zuazua-Villar, M. A. Prado, E. D. Valle, J. M. Iglesias, C. Martinez-Campa, P. S. Lazo et S. Ramos. 2007. «Characterization of HSP27 phosphorylation induced by microtubule interfering agents: implication of p38 signalling pathway». *Arch Biochem Biophys.* vol. 461, no 1, p. 123-129. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17367746>.

Catahier, Salmane, et Jean Charles Sournia. 1989. *Histoire de la d'écouverte de la petite circulation sanguine*. [Rabat]: Organisation Islamique pour l'Éducation, les sciences et la culture.

Chandra, D., G. Choy, X. Deng, B. Bhatia, P. Daniel et D. G. Tang. 2004. «Association of active caspase 8 with the mitochondrial membrane during apoptosis: potential roles in cleaving BAP31 and caspase 3 and mediating mitochondrion-endoplasmic reticulum cross

talk in etoposide-induced cell death». *Mol Cell Biol.* vol. 24, no 15, p. 6592-6607. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254227>.

Chang, H. Y., H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo et D. Baltimore. 1998. «Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx». *Science.* vol. 281, no 5384, p. 1860-1863. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9743501>.

Chang, J. E., D. Khuntia, H. I. Robins et M. P. Mehta. 2007. «Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme». *Clin Adv Hematol Oncol.* vol. 5, no 11, p. 894-902, 907-815. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18185489>.

Chang, Y., A. Abe et J. A. Shayman. 1995. «Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystallin transcription». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 92, no 26, p. 12275-12279. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8618884>.

Chaparro, M., P. Sanz-Cameno, M. Trapero-Marugan, L. Garcia-Buey et R. Moreno-Otero. 2007. «Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease». *Ann Hepatol.* vol. 6, no 4, p. 208-213. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18007549>.

Charette, S. J., et J. Landry. 2000. «The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 926, p. 126-131. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11193028>.

Charette, S. J., J. N. Lavoie, H. Lambert et J. Landry. 2000. «Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27». *Mol Cell Biol.* vol. 20, no 20, p. 7602-7612. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11003656>.

Chauhan, D., G. Li, T. Hideshima, K. Podar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, L. Catley, Y. T. Tai, T. Hayashi, R. Shringarpure, R. Burger, N. Munshi, Y. Ohtake, S. Saxena et K. C. Anderson. 2003. «Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance». *Blood.* vol. 102, no 9, p. 3379-3386. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12855565>.

Chayama, K., P. J. Papst, T. P. Garrington, J. C. Pratt, T. Ishizuka, S. Webb, S. Ganiatsas, L. I. Zon, W. Sun, G. L. Johnson et E. W. Gelfand. 2001. «Role of MEKK2-MEK5 in the regulation of TNF-alpha gene expression and MEKK2-MKK7 in the activation of c-Jun N-terminal kinase in mast cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 98, no 8, p. 4599-4604. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11274363>.

Chelsea. 2008. *Biology of cancer*. New York: Chelsea House Infobase.

Chen, C. L., C. F. Lin, W. T. Chang, W. C. Huang, C. F. Teng et Y. S. Lin. 2008. «Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway». *Blood*. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18270325>.

Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams et D. C. Huang. 2005. «Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function». *Mol Cell*. vol. 17, no 3, p. 393-403. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694340>.

Chen, Q., D. T. Fisher, S. A. Kucinska, W. C. Wang et S. S. Evans. 2006. «Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress». *Cancer Immunol Immunother*. vol. 55, no 3, p. 299-311. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16044255>.

Cheng, M., T. G. Boulton et M. H. Cobb. 1996. «ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase». *J Biol Chem*. vol. 271, no 15, p. 8951-8958. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8621539>.

Chiariello, M., M. J. Marinissen et J. S. Gutkind. 2000. «Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation». *Mol Cell Biol*. vol. 20, no 5, p. 1747-1758. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669751>.

Chipuk, J. E., et D. R. Green. 2004. «Cytoplasmic p53: bax and forward». *Cell Cycle*. vol. 3, no 4, p. 429-431. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15020844>.

Choi, Y. H., S. J. Lee, P. Nguyen, J. S. Jang, J. Lee, M. L. Wu, E. Takano, M. Maki, P. A.

Henkart et J. B. Trepel. 1997. «Regulation of cyclin D1 by calpain protease». *J Biol Chem.* vol. 272, no 45, p. 28479-28484. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353308>.

Ciocca, D. R., et S. K. Calderwood. 2005. «Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications». *Cell Stress Chaperones.* vol. 10, no 2, p. 86-103. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16038406>.

Ciocca, D. R., S. A. Fuqua, S. Lock-Lim, D. O. Toft, W. J. Welch et W. L. McGuire. 1992. «Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs». *Cancer Res.* vol. 52, no 13, p. 3648-3654. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1617638>.

Ciocca, D. R., S. Oesterreich, G. C. Chamness, W. L. McGuire et S. A. Fuqua. 1993. «Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review». *J Natl Cancer Inst.* vol. 85, no 19, p. 1558-1570. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8411230>.

Clayson, D. B. 2001. *Toxicological carcinogenesis*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Clemons, N. J., K. Buzzard, R. Steel et R. L. Anderson. 2005. «Hsp72 inhibits Fas-mediated apoptosis upstream of the mitochondria in type II cells». *J Biol Chem.* vol. 280, no 10, p. 9005-9012. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15632129>.

Coates, P. J. 2007. «p53 and Mdm2: not all cells are equal». *J Pathol.* vol. 213, no 4, p. 357-359. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17973240>.

Cohen-Armon, M. 2007. «PARP-1 activation in the ERK signaling pathway». *Trends Pharmacol Sci.* vol. 28, no 11, p. 556-560. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17950909>.

Colomer, J., et A. R. Means. 2007. «Physiological roles of the Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase cascade in health and disease». *Subcell Biochem.* vol. 45, p. 169-214. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18193638>.

Concannon, C. G., S. Orrenius et A. Samali. 2001. «Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c». *Gene Expr.* vol. 9, no 4-5, p. 195-201. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11444529>.

Corda, S., C. Laplace, E. Vicaut et J. Duranteau. 2001. «Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide». *Am J Respir Cell Mol Biol.* vol. 24, no 6, p. 762-768. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11415943>.

Corominas, M., C. Roncero, M. Ribases, X. Castells et M. Casas. 2007. «Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction». *Neuropsychobiology.* vol. 55, no 1, p. 2-13. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17556847>.

Coroneos, E., Y. Wang, J. R. Panuska, D. J. Templeton et M. Kester. 1996. «Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades». *Biochem J.* vol. 316 (Pt 1), p. 13-17. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8645194>.

Costantini, P., B. V. Chernyak, V. Petronilli et P. Bernardi. 1996. «Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites». *J Biol Chem.* vol. 271, no 12, p. 6746-6751. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8636095>.

Cottin, P., P. L. Vidalenc et A. Ducastaing. 1981. «Ca²⁺-dependent association between a Ca²⁺-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor». *FEBS Lett.* vol. 136, no 2, p. 221-224. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6276228>.

Craxton, A., G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs et E. A. Clark. 1998. «p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes». *J Immunol.* vol. 161, no 7, p. 3225-3236. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759836>.

Creagh, E. M., D. Sheehan et T. G. Cotter. 2000. «Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells». *Leukemia.* vol. 14, no 7, p. 1161-1173. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10914538>.

- Cribb, A. E., M. Peyrou, S. Muruganandan et L. Schneider. 2005. «The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity». *Drug Metab Rev.* vol. 37, no 3, p. 405-442. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16257829>.
- Criss, Wayne E. 2003. «Molecular Mechanisms of Toxic Chemicals». *Indoor and Built Environment.* vol. 12, no 6, p. 395-399.
- Croall, D. E., et K. S. McGrody. 1994. «Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin». *Biochemistry.* vol. 33, no 45, p. 13223-13230. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7947729>.
- Crompton, M. 2000. «Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 12, no 4, p. 414-419. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10873816>.
- Csermely, P., T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka et G. Nardai. 1998. «The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review». *Pharmacol Ther.* vol. 79, no 2, p. 129-168. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9749880>.
- Cuenda, A., P. Cohen, V. Buee-Scherrer et M. Goedert. 1997. «Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)». *Embo J.* vol. 16, no 2, p. 295-305. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9029150>.
- Cuenda, A., et D. S. Dorow. 1998. «Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1». *Biochem J.* vol. 333 (Pt 1), p. 11-15. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9639556>.
- Cuervo, A. M., E. Bergamini, U. T. Brunk, W. Droge, M. Ffrench et A. Terman. 2005. «Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells». *Autophagy.* vol. 1, no 3, p. 131-140. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16874025>.
- Cuesta, R., G. Laroia et R. J. Schneider. 2000. «Chaperone hsp27 inhibits translation during

heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes». *Genes Dev.* vol. 14, no 12, p. 1460-1470. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10859165>.

Cummings, M. 1995. «Increased c-fos expression associated with hyperthermia-induced apoptosis of a Burkitt lymphoma cell line». *Int J Radiat Biol.* vol. 68, no 6, p. 687-692. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8551112>.

Da Silva, J., B. Pierrat, J. L. Mary et W. Lesslauer. 1997. «Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes». *J Biol Chem.* vol. 272, no 45, p. 28373-28380. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353295>.

Dandekar, S. P., G. D. Nadkarni, V. S. Kulkarni et S. Puneekar. 2002. «Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility». *J Postgrad Med.* vol. 48, no 3, p. 186-189; discussion 189-190. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432192>.

Daniel, J. C., et W. R. Smythe. 2004. «The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer». *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* vol. 16, no 1, p. 19-27. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15366684>.

Darmon, Pierre. 1993. *Les cellules folles : l'homme face au cancer, de l'antiquité à nos jours*. Coll. «Civilisations et mentalités». Paris: Plon.

D'Auria, G., M. Ciprotti, D. Conte, R. Iacovelli, A. Palazzo, A. Pellegrino et E. Cortesi. 2007. «Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy in bladder cancer». *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* vol. 18, p. 162-163.

David, J. C., et J. F. Grongnet. 2001. «Perinatal expression of heat-shock protein 90 in different regions of the brain and in non-neural tissues of the piglet». *Biol Neonate.* vol. 79, no 2, p. 131-139. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11223655>.

Davis, R. J. 2000. «Signal transduction by the JNK group of MAP kinases». *Cell.* vol. 103, no 2, p. 239-252. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11057897>.

De Chiara, G., M. E. Marcocci, M. Torcia, M. Lucibello, P. Rosini, P. Bonini, Y. Higashimoto, G. Damonte, A. Armirotti, S. Amodei, A. T. Palamara, T. Russo, E. Garaci et F. Cozzolino. 2006. «Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences». *J Biol Chem.* vol. 281, no 30, p. 21353-21361. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16714293>.

De Maio, A., S. C. Beck et T. G. Buchman. 1993. «Heat shock gene expression and development of translational thermotolerance in human hepatoblastoma cells». *Circ Shock.* vol. 40, no 3, p. 177-186. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8394222>.

-----, 1993. «Induction of translational thermotolerance in liver of thermally stressed rats». *Eur J Biochem.* vol. 218, no 2, p. 413-420. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8269929>.

De Maria, R., M. R. Rippo, E. H. Schuchman et R. Testi. 1998. «Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells». *J Exp Med.* vol. 187, no 6, p. 897-902. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9500792>.

Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq et D. R. Alessi. 1998. «Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB». *Embo J.* vol. 17, no 15, p. 4426-4441. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9687510>.

Demers, N., E. Agostinelli, D. A. Averill-Bates et G. Fortier. 2001. «Immobilization of native and poly(ethylene glycol)-treated ('PEGylated') bovine serum amine oxidase into a biocompatible hydrogel». *Biotechnol Appl Biochem.* vol. 33, no Pt 3, p. 201-207. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11389674>.

Deng, X., F. Gao et W. S. May, Jr. 2003. «Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS». *Blood.* vol. 102, no 9, p. 3179-3185. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12855558>.

Denning, T. L., H. Takaishi, S. E. Crowe, I. Boldogh, A. Jevnikar et P. B. Ernst. 2002. «Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells». *Free Radic Biol Med.* vol. 33, no 12, p. 1641-1650. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12488132>.

Dennis, J. W., M. Granovsky et C. E. Warren. 1999. «Glycoprotein glycosylation and cancer progression». *Biochimica et biophysica acta*. vol. 1473, no 1, p. 21-34.

Deocaris, C. C., S. C. Kaul et R. Wadhwa. 2006. «On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60». *Cell Stress Chaperones*. vol. 11, no 2, p. 116-128. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16817317>.

Devadas, S., J. A. Hinshaw, L. Zaritskaya et M. S. Williams. 2003. «Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis». *Free Radic Biol Med*. vol. 35, no 6, p. 648-661. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12957657>.

Devary, Y., C. Rosette, J. A. DiDonato et M. Karin. 1993. «NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal». *Science*. vol. 261, no 5127, p. 1442-1445. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8367725>.

Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsedale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1998. «IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases». *Embo J*. vol. 17, no 8, p. 2215-2223. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9545235>.

Dickson, R. C., C. Sumanasekera et R. L. Lester. 2006. «Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*». *Prog Lipid Res*. vol. 45, no 6, p. 447-465. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16730802>.

Ding, X. Z., G. C. Tsokos et J. G. Kiang. 1998. «Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity». *Faseb J*. vol. 12, no 6, p. 451-459. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9535217>.

Divisi, D., S. Di Tommaso, S. Salvemini, M. Garramone et R. Crisci. 2006. «Diet and cancer». *Acta Biomed*. vol. 77, no 2, p. 118-123. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17172193>.

Dobrowsky, R. T., et Y. A. Hannun. 1993. «Ceramide-activated protein phosphatase: partial purification and relationship to protein phosphatase 2A». *Adv Lipid Res.* vol. 25, p. 91-104. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8396314>.

Dong, Z., P. Saikumar, J. M. Weinberg et M. A. Venkatachalam. 1997. «Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases». *Am J Pathol.* vol. 151, no 5, p. 1205-1213. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9358745>.

Dorion, S., H. Lambert et J. Landry. 2002. «Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1». *J Biol Chem.* vol. 277, no 34, p. 30792-30797. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077134>.

Dorion, S., et J. Landry. 2002. «Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock». *Cell Stress Chaperones.* vol. 7, no 2, p. 200-206. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12380688>.

Douziech, M., G. Laberge, G. Grondin, N. Daigle et R. Blouin. 1999. «Localization of the mixed-lineage kinase DLK/MUK/ZPK to the Golgi apparatus in NIH 3T3 cells». *J Histochem Cytochem.* vol. 47, no 10, p. 1287-1296. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490457>.

Drognitz, O., P. Michel, D. Koczan, H. Neeff, Y. Mikami, R. Obermaier, H. J. Thiesen, U. T. Hopt et M. Loebler. 2006. «Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation». *Transplantation.* vol. 81, no 10, p. 1428-1434. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16732181>.

Drummond, I. A., D. Livingstone et R. A. Steinhardt. 1988. «Heat shock protein synthesis and cytoskeletal rearrangements occur independently of intracellular free calcium increases in Drosophila cells and tissues». *Radiat Res.* vol. 113, no 3, p. 402-413. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3126536>.

Drummond, I. A., S. A. McClure, M. Poenie, R. Y. Tsien et R. A. Steinhardt. 1986. «Large changes in intracellular pH and calcium observed during heat shock are not responsible for the induction of heat shock proteins in Drosophila melanogaster». *Mol Cell Biol.* vol. 6, no 5,

p. 1767-1775. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3097504>.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li et X. Wang. 2000. «Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition». *Cell*. vol. 102, no 1, p. 33-42. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929711>.

Dube, D. K., G. Seal et L. A. Loeb. 1976. «Differential heat sensitivity of mammalian DNA polymerases». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 76, no 2, p. 483-487. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=194602>.

Dulak, J., J. Deshane, A. Jozkowicz et A. Agarwal. 2008. «Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis». *Circulation*. vol. 117, no 2, p. 231-241. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18195184>.

Dumont, P., A. Della Pietra et M. E. Murphy. 2003. «Methods to study p53-repressed promoters». *Methods Mol Biol*. vol. 234, p. 111-120. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12824528>.

Ealy, A. D., M. Drost, C. M. Barros et P. J. Hansen. 1992. «Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine». *Cell Biol Int Rep*. vol. 16, no 2, p. 125-131. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1551144>.

Ealy, A. D., J. L. Howell, V. H. Monterroso, C. F. Arechiga et P. J. Hansen. 1995.

«Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants». *J Anim Sci*. vol. 73, no 5, p. 1401-1407. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7665370>.

Ebacher A., Laverdière J., Nabid A., Diaz de la Bedoya L., Harel F. 2003. «60 Sexual dysfunction in patients with localized prostate cancer treated with hormonotherapy and radiotherapy». *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. vol. 69, no 1, p. S15.

Elce, J. S., P. L. Davies, C. Hegadorn, D. H. Maurice et J. S. Arthur. 1997. «The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation». *Biochem J*. vol. 326 (Pt 1), p. 31-38. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9337847>.

Elliott-Hunt, C. R., R. J. Pope, P. Vanderplank et D. Wynick. 2007. «Activation of the galanin receptor 2 (GalR2) protects the hippocampus from neuronal damage». *J Neurochem.* vol. 100, no 3, p. 780-789. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17263796>.

Ellis, S., M. Killender et R. L. Anderson. 2000. «Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy». *J Histochem Cytochem.* vol. 48, no 3, p. 321-332. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10681386>.

Elmore, S. 2007. «Apoptosis: a review of programmed cell death». *Toxicol Pathol.* vol. 35, no 4, p. 495-516. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17562483>.

Engin, K. 1994. «Biological rationale for hyperthermia in cancer treatment (II)». *Neoplasma.* vol. 41, no 5, p. 277-283. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7854498>.

-----, 1994. «Hyperthermia in cancer treatment (I)». *Neoplasma.* vol. 41, no 5, p. 269-276. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7854497>.

English, J. M., G. Pearson, R. Baer et M. H. Cobb. 1998. «Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases». *J Biol Chem.* vol. 273, no 7, p. 3854-3860. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9461566>.

English, J. M., G. Pearson, T. Hockenberry, L. Shivakumar, M. A. White et M. H. Cobb. 1999. «Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control». *J Biol Chem.* vol. 274, no 44, p. 31588-31592. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10531364>.

Ermak, N., B. Lacour, T. B. Drueke et S. Vicca. 2008. «Role of reactive oxygen species and Bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes». *Atherosclerosis.* En ligne.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

&list_uids=18282575 >.

Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson et J. C. Martinou. 2000. «Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane». *Mol Cell Biol.* vol. 20, no 3, p. 929-935. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10629050>.

Essmann, F., S. Pohlmann, B. Gillissen, P. T. Daniel, K. Schulze-Osthoff et R. U. Janicke. 2005. «Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 280, no 44, p. 37169-37177. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16148012>.

Evan, G., et T. Littlewood. 1998. «A matter of life and cell death». *Science.* vol. 281, no 5381, p. 1317-1322. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9721090>.

Evans, T. G., Z. Belak, N. Ovsenek et P. H. Krone. 2007. «Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish». *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* vol. 146, no 1, p. 131-140. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17134927>.

Eveno, C., S. Dagois, E. Guillot, J. M. Gornet et M. Pocard. 2008. «[Treatment of peritoneal carcinomatosis with surgery and hyperthermic peroperative intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): new aspects and validated indications]». *Bull Cancer.* vol. 95, no 1, p. 141-145. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18230580>.

Everts, M. 2007. «Thermal scalpel to target cancer». *Expert Rev Med Devices.* vol. 4, no 2, p. 131-136. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17359220>.

Ewing, J. F., S. N. Haber et M. D. Maines. 1992. «Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein». *J Neurochem.* vol. 58, no 3, p. 1140-1149. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1737989>.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton et P. M. Henson. 1992. «Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages». *J Immunol.* vol. 148, no 7, p. 2207-2216.

En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1545126>.

Faguet, Guy B. 2005. *The war on cancer : an anatomy of failure, a blueprint for the future*. Dordrecht: Springer.

Fairfield, D. A., A. C. Kanicki, M. I. Lomax et R. A. Altschuler. 2004. «Induction of heat shock protein 32 (Hsp32) in the rat cochlea following hyperthermia». *Hear Res.* vol. 188, no 1-2, p. 1-11. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14759565>.

Fajardo, J. E., T. J. Geller, H. M. Koenig et M. L. Kleine. 1982. «Chronic meningitis, polyarthritis, lymphadenitis, and pulmonary hemosiderosis». *The Journal of pediatrics*. vol. 101, no 5, p. 738-740.

Falloon, E. A., et J. R. Dynlacht. 2002. «Reversible changes in the nuclear lamina induced by hyperthermia». *J Cell Biochem.* vol. 86, no 3, p. 451-460. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12210752>.

Farmer, S. R. 2005. «Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis». *Int J Obes (Lond)*. vol. 29 Suppl 1, p. S13-16. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15711576>.

Farrell, A. M., Y. Uchida, M. M. Nagiec, I. R. Harris, R. C. Dickson, P. M. Elias et W. M. Holleran. 1998. «UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes». *J Lipid Res.* vol. 39, no 10, p. 2031-2038. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9788249>.

Favatier, F., L. Bornman, L. E. Hightower, E. Gunther et B. S. Polla. 1997. «Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance?». *Cell Stress Chaperones*. vol. 2, no 3, p. 141-155. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9314601>.

Fernandez-Gomez, F. J., M. D. Pastor, E. M. Garcia-Martinez, R. Melero-Fernandez de Mera, M. Gou-Fabregas, M. Gomez-Lazaro, S. Calvo, R. M. Soler, M. F. Galindo et J. Jordan. 2006. «Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione peroxidase expression». *Neurobiol Dis.* vol. 24, no 2, p. 296-307. En ligne.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=16978869 >.

Festjens, N., S. Cornelis, M. Lamkanfi et P. Vandenabeele. 2006. «Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation». *Biol Chem.* vol. 387, no 8, p. 1005-1016. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16895469>.

Field, S. B., et R. L. Anderson. 1982. «Thermotolerance: a review of observations and possible mechanisms». *Natl Cancer Inst Monogr.* vol. 61, p. 193-201. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7177179>.

Fields, J., J. J. Hanisch, J. W. Choi et P. M. Hwang. 2007. «How does p53 regulate mitochondrial respiration?». *IUBMB Life.* vol. 59, no 10, p. 682-684. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18027443>.

Fiorentini, G., et A. Szasz. 2006. «Hyperthermia today: electric energy, a new opportunity in cancer treatment». *J Cancer Res Ther.* vol. 2, no 2, p. 41-46. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17998673>.

Flanagan, S. W., P. L. Moseley et G. R. Buettner. 1998. «Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping». *FEBS Lett.* vol. 431, no 2, p. 285-286. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9708920>.

Fleming, Y., C. G. Armstrong, N. Morrice, A. Paterson, M. Goedert et P. Cohen. 2000. «Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7». *Biochem J.* vol. 352 Pt 1, p. 145-154. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11062067>.

Foltz, I. N., J. C. Lee, P. R. Young et J. W. Schrader. 1997. «Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway». *J Biol Chem.* vol. 272, no 6, p. 3296-3301. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9013568>.

Foufelle, F., et P. Ferre. 2007. «[Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]». *Med Sci (Paris).* vol. 23, no 3, p. 291-296. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17349291>.

Fox, M. S., et S. Klawansky. 2006. «Interruption of cell transformation and cancer formation». *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. vol. 20, no 13, p. 2209-2213.

Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, C. Borner, W. L. Kelley, J. Tschopp, D. P. Lew, N. Demareux et K. H. Krause. 2000. «Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 97, no 11, p. 5723-5728. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10823933>.

Freind, John, Antoine Coulet, Bakhtishu Jibril ibn et al Saliliani Sulaiman ibn Ya'kub. 1727. *Histoire de la médecine depuis Galien, jusqu'au commencement du seizième siècle. Ou l'on voit les progrès de cet art de siècle en siècle, par rapport principalement à la pratique ... écrite en forme de discours adressés au Docteur Mead*. Leide: Chez Jean Arn. Langerak.

Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan et J. Saklatvala. 1994. «Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27». *Cell*. vol. 78, no 6, p. 1039-1049. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7923354>.

Fujisawa, T., K. Takeda et H. Ichijo. 2007. «ASK family proteins in stress response and disease». *Mol Biotechnol*. vol. 37, no 1, p. 13-18. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17914158>.

Fukami, T., S. Nakasu, K. Baba, M. Nakajima et M. Matsuda. 2004. «Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and apoptosis in human glioma cell lines». *J Neurooncol*. vol. 70, no 3, p. 319-331. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15662973>.

Fukunaga, R., et T. Hunter. 1997. «MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates». *Embo J*. vol. 16, no 8, p. 1921-1933. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9155018>.

Fuse, T., K. Yamada, K. Asai, T. Kato et M. Nakanishi. 1996. «Heat shock-mediated cell cycle arrest is accompanied by induction of p21 CKI». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 225, no 3, p. 759-763. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8780686>.

Fuse, T., K. W. Yoon, T. Kato et K. Yamada. 1998. «Heat-induced apoptosis in human glioblastoma cell line A172». *Neurosurgery*. vol. 42, no 4, p. 843-849. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9574649>.

Fuster, J. J., S. M. Sanz-Gonzalez, U. M. Moll et V. Andres. 2007. «Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy». *Trends Mol Med*. vol. 13, no 5, p. 192-199. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17383232>.

Gabai, V. L., K. Mabuchi, D. D. Mosser et M. Y. Sherman. 2002. «Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis». *Mol Cell Biol*. vol. 22, no 10, p. 3415-3424. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11971973>.

-----, 2002. «Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis». *Mol Cell Biol*. vol. 22, no 10, p. 3415-3424. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11971973>.

Gabai, V. L., A. B. Meriin, D. D. Mosser, A. W. Caron, S. Rits, V. I. Shifrin et M. Y. Sherman. 1997. «Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance». *J Biol Chem*. vol. 272, no 29, p. 18033-18037. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9218432>.

Gabai, V. L., A. B. Meriin, J. A. Yaglom, J. Y. Wei, D. D. Mosser et M. Y. Sherman. 2000. «Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation». *J Biol Chem*. vol. 275, no 48, p. 38088-38094. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10978340>.

Gaffney, E. A. 2004. «The application of mathematical modelling to aspects of adjuvant chemotherapy scheduling». *J Math Biol*. vol. 48, no 4, p. 375-422. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15052504>.

Gallen, C. 2006. «Specific immunotherapy and atopy». *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. vol. 46, p. S35-S39.

Gandini, Sara, Edoardo Botteri, Simona Iodice, Mathieu Boniol, Albert B. Lowenfels, Patrick Maisonneuve et Peter Boyle. 2008. «Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis».

International journal of cancer. Journal international du cancer. vol. 122, no 1, p. 155.

Garba, A., S. Toure, R. Dembele, E. Bosque-Oliva et A. Fenwick. 2006. «Implementation of national schistosomiasis control programmes in West Africa». *Trends Parasitol.* vol. 22, no 7, p. 322-326. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16690357>.

Garcia-Ruiz, C., A. Colell, M. Mari, A. Morales et J. C. Fernandez-Checa. 1997. «Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione». *J Biol Chem.* vol. 272, no 17, p. 11369-11377. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9111045>.

Garcia-Ruiz, C., M. Mari, A. Morales, A. Colell, E. Ardite et J. C. Fernandez-Checa. 2000. «Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes». *Hepatology.* vol. 32, no 1, p. 56-65. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10869289>.

Garnier, C., D. Lafitte, T. J. Jorgensen, O. N. Jensen, C. Briand et V. Peyrot. 2001. «Phosphorylation and oligomerization states of native pig brain HSP90 studied by mass spectrometry». *Eur J Biochem.* vol. 268, no 8, p. 2402-2407. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11298759>.

Garrido, C., P. Ottavi, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo, B. Chauffert et P. Mehlen. 1997. «HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs». *Cancer Res.* vol. 57, no 13, p. 2661-2667. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9205074>.

Gerber, D. E. 2008. «Targeted therapies: a new generation of cancer treatments». *Am Fam Physician.* vol. 77, no 3, p. 311-319. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18297955>.

Germa Lluch, J. R., M. A. Segui Palmer, M. A. Climent Duran, R. Blanco Guerrero, A. Fernandez Sagarra, H. Villavicencio et F. J. Sole Balcells. 1992. «Intensive chemotherapy in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors of the testis». *Eur Urol.* vol. 21, no 4, p. 287-293. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1333957>.

Germain, M., J. P. Mathai et G. C. Shore. 2002. «BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria». *J Biol Chem.* vol. 277, no 20, p. 18053-18060. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11884414>.

Germain, M., J. Milburn et V. Duronio. 2008. «MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction». *J Biol Chem.* vol. 283, no 10, p. 6384-6392. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18089567>.

Gething, M. J. 1999. «Role and regulation of the ER chaperone BiP». *Semin Cell Dev Biol.* vol. 10, no 5, p. 465-472. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10597629>.

Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T. A. Knoch, E. A. Auerswald, K. Welsh, J. C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G. S. Salvesen et W. Machleidt. 2002. «Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members». *J Biol Chem.* vol. 277, no 30, p. 27217-27226. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12000759>.

Giovino, G. A. 2007. «The tobacco epidemic in the United States». *Am J Prev Med.* vol. 33, no 6 Suppl, p. S318-326. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18021906>.

Givel, J. C., I. Langer et N. Demartines. 2007. «[Surgery]». *Rev Med Suisse.* vol. 3, no 94, p. 116-118, 120-111. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17354535>.

Glading, A., R. J. Bodnar, I. J. Reynolds, H. Shiraha, L. Satish, D. A. Potter, H. C. Blair et A. Wells. 2004. «Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation». *Mol Cell Biol.* vol. 24, no 6, p. 2499-2512. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14993287>.

Glading, A., P. Chang, D. A. Lauffenburger et A. Wells. 2000. «Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway». *J Biol Chem.* vol. 275, no 4, p. 2390-2398. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10644690>.

Glanz, K., D. B. Buller et M. Saraiya. 2007. «Reducing ultraviolet radiation exposure among outdoor workers: state of the evidence and recommendations». *Environ Health*. vol. 6, p. 22. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17686155>.

Godefroy, N., C. Lemaire, B. Mignotte et J. L. Vayssiere. 2006. «p53 and Retinoblastoma protein (pRb): a complex network of interactions». *Apoptosis*. vol. 11, no 5, p. 659-661. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16554964>.

Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes et P. Cohen. 1997. «Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases». *Embo J*. vol. 16, no 12, p. 3563-3571. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9218798>.

Goetz, M. P., D. O. Toft, M. M. Ames et C. Erlichman. 2003. «The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy». *Ann Oncol*. vol. 14, no 8, p. 1169-1176. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12881371>.

Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei et J. Cong. 2003. «The calpain system». *Physiol Rev*. vol. 83, no 3, p. 731-801. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12843408>.

Gong, B., Q. Chen, B. Endlich, S. Mazumder et A. Almasan. 1999. «Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases». *Cell Growth Differ*. vol. 10, no 7, p. 491-502. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10437917>.

Gonzalez-Zulueta, M., A. B. Feldman, L. J. Klesse, R. G. Kalb, J. F. Dillman, L. F. Parada, T. M. Dawson et V. L. Dawson. 2000. «Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 97, no 1, p. 436-441. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10618436>.

Gradzka, I. 2006. «[Mechanisms and regulation of the programmed cell death]». *Postepy Biochem*. vol. 52, no 2, p. 157-165. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17078505>.

Graham, D. Y. 2001. «Helicobacter pylori and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: interaction with proton pump inhibitor therapy for prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug ulcers and ulcer complications--future research needs». *Am J Med.* vol. 110, no 1A, p. 58S-61S. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11166000>.

Griendling, K. K., et M. Ushio-Fukai. 2000. «Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling». *Regul Pept.* vol. 91, no 1-3, p. 21-27. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10967199>.

Grinberg, M., R. Sarig, Y. Zaltsman, D. Frumkin, N. Grammatikakis, E. Reuveny et A. Gross. 2002. «tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 277, no 14, p. 12237-12245. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11805084>.

Guangzuo, L., A. Gruhler, Y. Liu, O. N. Jensen et R. C. Dickson. 2008. «The sphingolipid long-chain base-PKH1/2-YPK1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover». *J Biol Chem.* En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18296441>.

Guarente, Leonard, Linda Partridge et Douglas C. Wallace. 2008. *Molecular biology of aging.* Coll. «Cold Spring Harbor monograph series, 51». Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J. N. Lavoie, J. Huot et J. Landry. 1997. «Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27». *J Cell Sci.* vol. 110 (Pt 3), p. 357-368. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9057088>.

Guerin, P., S. El Mouatassim et Y. Menezo. 2001. «Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings». *Hum Reprod Update.* vol. 7, no 2, p. 175-189. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11284661>.

Guillot, Bernard. 2006. *Chimiothérapie et immunothérapie du mélanome.* Coll. «Collection Espace science». Montpellier: Éditions Espaces 34.

Gupta, A., S. F. Rosenberger et G. T. Bowden. 1999. «Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines». *Carcinogenesis*. vol. 20, no 11, p. 2063-2073. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10545407>.

Gupta, S. 2005. «Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging». *Immunol Rev*. vol. 205, p. 114-129. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15882349>.

Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard et R. J. Davis. 1996. «Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors». *Embo J*. vol. 15, no 11, p. 2760-2770. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8654373>.

Gurbuxani, S., E. Schmitt, C. Cande, A. Parcellier, A. Hammann, E. Daugas, I. Kouranti, C. Spahr, A. Pance, G. Kroemer et C. Garrido. 2003. «Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor». *Oncogene*. vol. 22, no 43, p. 6669-6678. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14555980>.

Gustafson, S., K. M. Zbuk, C. Scacheri et C. Eng. 2007. «Cowden syndrome». *Semin Oncol*. vol. 34, no 5, p. 428-434. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17920899>.

Gustafsson, A. J., et M. S. Islam. 2005. «[Cellular calcium ion signalling--from basic research to benefits for patients]». *Lakartidningen*. vol. 102, no 44, p. 3214-3219. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16329451>.

Habash, R. W., R. Bansal, D. Krewski et H. T. Alhafid. 2006. «Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy». *Crit Rev Biomed Eng*. vol. 34, no 6, p. 459-489. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17725479>.

-----, 2006. «Thermal therapy, part 2: hyperthermia techniques». *Crit Rev Biomed Eng*. vol. 34, no 6, p. 491-542. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17725480>.

Hacker, G., S. Kirschnek et S. F. Fischer. 2006. «Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus». *Med Microbiol Immunol*. vol. 195, no 1, p.

11-19. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16086183>.

Haddad, J. J. 2007. «The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK(ERK): discordant proteomic effect of MAPK(p38)». *Protein Pept Lett.* vol. 14, no 4, p. 361-371. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17504094>.

Hadley, H. G. 1967. «Cancer and heredity». *The Central African journal of medicine.* vol. 13, no 5, p. 126-128.

Haffty, Bruce G., et Lynn D. Wilson. 2009. *Handbook of radiation oncology : basic principles and clinical protocols.* Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett.

Hahn, G. M., et D. P. Strande. 1976. «Cytotoxic effects of hyperthermia and adriamycin on Chinese hamster cells». *J Natl Cancer Inst.* vol. 57, no 5, p. 1063-1067. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1003542>.

Ham, J., C. Babij, J. Whitfield, C. M. Pfarr, D. Lallemand, M. Yaniv et L. L. Rubin. 1995. «A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death». *Neuron.* vol. 14, no 5, p. 927-939. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7748560>.

Han, J., J. D. Lee, P. S. Tobias et R. J. Ulevitch. 1993. «Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14». *J Biol Chem.* vol. 268, no 33, p. 25009-25014. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7693711>.

Han, J., et P. Sun. 2007. «The pathways to tumor suppression via route p38». *Trends Biochem Sci.* vol. 32, no 8, p. 364-371. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17624785>.

Han, S. I., K. S. Ha, K. I. Kang, H. D. Kim et H. S. Kang. 2000. «Heat shock-induced actin polymerization, SAPK/JNK activation, and heat-shock protein expression are mediated by genistein-sensitive tyrosine kinase(s) in K562 cells». *Cell Biol Int.* vol. 24, no 7, p. 447-457. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10875892>.

Han, S. I., S. Y. Oh, S. H. Woo, K. H. Kim, J. H. Kim, H. D. Kim et H. S. Kang. 2001.

«Implication of a small GTPase Rac1 in the activation of c-Jun N-terminal kinase and heat shock factor in response to heat shock». *J Biol Chem.* vol. 276, no 3, p. 1889-1895. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11050083>.

Han, S. J., K. Y. Choi, P. T. Brey et W. J. Lee. 1998. «Molecular cloning and characterization of a *Drosophila* p38 mitogen-activated protein kinase». *J Biol Chem.* vol. 273, no 1, p. 369-374. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9417090>.

Hanna, Louise, Tom Crosby et Fergus Macbeth. 2008. *Practical clinical oncology*. Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press.

Hanna, R. A., B. E. Garcia-Diaz et P. L. Davies. 2007. «Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants». *FEBS Lett.* vol. 581, no 16, p. 2894-2898. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17543955>.

Hannun, Y. A. 1996. «Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress». *Science.* vol. 274, no 5294, p. 1855-1859. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8943189>.

Hanson, C. J., M. D. Bootman, C. W. Distelhorst, T. Maraldi et H. L. Roderick. 2008. «The cellular concentration of Bcl-2 determines its pro- or anti-apoptotic effect». *Cell Calcium.* En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18215418>.

Harlow, Ed, and Lane D. 1999. «Using Antibodies». *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Harrison, D., K. K. Griendling, U. Landmesser, B. Hornig et H. Drexler. 2003. «Role of oxidative stress in atherosclerosis». *Am J Cardiol.* vol. 91, no 3A, p. 7A-11A. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12645638>.

Harrison, D. G., H. Cai, U. Landmesser et K. K. Griendling. 2003. «Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease». *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* vol. 4, no 2, p. 51-61. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12806586>.

Hasday, J. D., et I. S. Singh. 2000. «Fever and the heat shock response: distinct, partially

overlapping processes». *Cell Stress Chaperones*. vol. 5, no 5, p. 471-480. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11189454>.

Hasegawa, A., X. Cheng, K. Kajino, A. Berezov, K. Murata, T. Nakayama, H. Yagita, R. Murali et M. I. Greene. 2004. «Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 101, no 17, p. 6599-6604. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15084739>.

Hasegawa, M., A. Cuenda, M. G. Spillantini, G. M. Thomas, V. Buee-Scherrer, P. Cohen et M. Goedert. 1999. «Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition». *J Biol Chem*. vol. 274, no 18, p. 12626-12631. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10212242>.

Hatai, T., A. Matsuzawa, S. Inoshita, Y. Mochida, T. Kuroda, K. Sakamaki, K. Kuida, S. Yonehara, H. Ichijo et K. Takeda. 2000. «Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation». *J Biol Chem*. vol. 275, no 34, p. 26576-26581. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10849426>.

Hatayama, T., N. Yamagishi, E. Minobe et K. Sakai. 2001. «Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 288, no 3, p. 528-534. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11676475>.

Hay, B. A., D. A. Wassarman et G. M. Rubin. 1995. «Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death». *Cell*. vol. 83, no 7, p. 1253-1262. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8548811>.

Hayashi, M., et J. D. Lee. 2004. «Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice». *J Mol Med*. vol. 82, no 12, p. 800-808. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15517128>.

Hayashi, M., R. I. Tapping, T. H. Chao, J. F. Lo, C. C. King, Y. Yang et J. D. Lee. 2001. «BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase». *J Biol Chem*. vol. 276, no 12, p. 8631-8634. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11254654>.

Hayat, M. A. 2008. *Cancer imaging*. Coll. «Cancer imaging». Amsterdam; Boston: Elsevier, Academic Press.

Heath-Engel, H. M., N. C. Chang et G. C. Shore. 2008. «The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family». *Oncogene*. vol. 27, no 50, p. 6419-6433. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18955970>.

Heidenreich, K. A., et J. L. Kummer. 1996. «Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons». *J Biol Chem*. vol. 271, no 17, p. 9891-9894. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8626622>.

Heidenreich, O., A. Neininger, G. Schratt, R. Zinck, M. A. Cahill, K. Engel, A. Kotlyarov, R. Kraft, S. Kostka, M. Gaestel et A. Nordheim. 1999. «MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo». *J Biol Chem*. vol. 274, no 20, p. 14434-14443. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10318869>.

Helewski, K. J., G. I. Kowalczyk-Ziomek et J. Konecki. 2006. «[Apoptosis and necrosis--two different ways leading to the same target]». *Wiad Lek*. vol. 59, no 9-10, p. 679-684. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17338129>.

Hellwig-Burgel, T., D. P. Stiehl, A. E. Wagner, E. Metzen et W. Jelkmann. 2005. «Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions». *J Interferon Cytokine Res*. vol. 25, no 6, p. 297-310. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15957953>.

Helmbrecht, K., E. Zeise et L. Rensing. 2000. «Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review». *Cell Prolif*. vol. 33, no 6, p. 341-365. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11101008>.

Hengartner, M. O. 2000. «The biochemistry of apoptosis». *Nature*. vol. 407, no 6805, p. 770-776. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11048727>.

Hengartner, M. O., et J. A. Bryant. 2000. «Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds?». *Symp Soc Exp Biol.* vol. 52, p. 1-12. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12090000>.

Hermisson, M., B. Wagenknecht, H. Wolburg, T. Glaser, J. Dichgans et M. Weller. 2000. «Sensitization to CD95 ligand-induced apoptosis in human glioma cells by hyperthermia involves enhanced cytochrome c release». *Oncogene.* vol. 19, no 19, p. 2338-2345. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10822385>.

Hermisson, M., et M. Weller. 2000. «Hyperthermia enhanced chemosensitivity of human malignant glioma cells». *Anticancer Res.* vol. 20, no 3A, p. 1819-1823. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10928113>.

Herrera, B., M. Fernandez, A. M. Alvarez, C. Roncero, M. Benito, J. Gil et I. Fabregat. 2001. «Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes». *Hepatology.* vol. 34, no 3, p. 548-556. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11526541>.

Herrlich, P., et H. J. Rahmsdorf. 1994. «Transcriptional and post-transcriptional responses to DNA-damaging agents». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 6, no 3, p. 425-431. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7917335>.

Hetman, M., et Z. Xia. 2000. «Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins». *Acta Neurobiol Exp (Wars).* vol. 60, no 4, p. 531-545. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11200182>.

Hetz, C. A. 2007. «ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage». *Antioxid Redox Signal.* vol. 9, no 12, p. 2345-2355. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17854276>.

Hetz, C. A., et C. Soto. 2006. «Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders». *Curr Mol Med.* vol. 6, no 1, p. 37-43. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16472111>.

Hildebrandt, B., et P. Wust. 2007. «Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs». *Cancer Treat Res.* vol. 134, p. 185-193. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

&list_uids=17633054>.

Hildebrandt, B., P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix et H. Riess. 2002. «The cellular and molecular basis of hyperthermia». *Crit Rev Oncol Hematol*. vol. 43, no 1, p. 33-56. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12098606>.

Hildeman, D. A., T. Mitchell, T. K. Teague, P. Henson, B. J. Day, J. Kappler et P. C. Marrack. 1999. «Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis». *Immunity*. vol. 10, no 6, p. 735-744. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10403648>.

Hildeman, D. A., Y. Zhu, T. C. Mitchell, J. Kappler et P. Marrack. 2002. «Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo». *Curr Opin Immunol*. vol. 14, no 3, p. 354-359. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11973134>.

Hill-Kapturczak, N., T. Jarmi et A. Agarwal. 2007. «Growth factors and heme oxygenase-1: perspectives in physiology and pathophysiology». *Antioxid Redox Signal*. vol. 9, no 12, p. 2197-2207. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17979525>.

Hobohm, U. 2001. «Fever and cancer in perspective». *Cancer Immunol Immunother*. vol. 50, no 8, p. 391-396. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11726133>.

-----, 2005. «Fever therapy revisited». *Br J Cancer*. vol. 92, no 3, p. 421-425. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15700041>.

Horsman, M. R., et J. Overgaard. 2007. «Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy». *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. vol. 19, no 6, p. 418-426. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17493790>.

Hosako, H., S. A. Little, M. Barrier et P. E. Mirkes. 2007. «Teratogen-induced activation of p53 in early postimplantation mouse embryos». *Toxicol Sci*. vol. 95, no 1, p. 257-269. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17068108>.

Howard, K. J., S. J. Holley, K. R. Yamamoto et C. W. Distelhorst. 1990. «Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor». *J Biol Chem.* vol. 265, no 20, p. 11928-11935. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2365707>.

Hsu, J. T., Y. C. Hsieh, W. H. Kan, J. G. Chen, M. A. Choudhry, M. G. Schwacha, K. I. Bland et I. H. Chaudry. 2007. «Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in estrogen-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage». *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* vol. 292, no 6, p. H2982-2987. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17293487>.

Hsu, Y. L., C. Y. Cho, P. L. Kuo, Y. T. Huang et C. C. Lin. 2006. «Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo». *J Pharmacol Exp Ther.* vol. 318, no 2, p. 484-494. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16632641>.

Huang, C., J. Li, M. Costa, Z. Zhang, S. S. Leonard, V. Castranova, V. Vallyathan, G. Ju et X. Shi. 2001. «Hydrogen peroxide mediates activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) by nickel subsulfide». *Cancer Res.* vol. 61, no 22, p. 8051-8057. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11719426>.

Huang, C., J. Li, M. Ding, S. S. Leonard, L. Wang, V. Castranova, V. Vallyathan et X. Shi. 2001. «UV Induces phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser-473 and Thr-308 in mouse epidermal Cl 41 cells through hydrogen peroxide». *J Biol Chem.* vol. 276, no 43, p. 40234-40240. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11507090>.

Huang, C., et R. T. Miller. 2007. «The calcium-sensing receptor and its interacting proteins». *J Cell Mol Med.* vol. 11, no 5, p. 923-934. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17979874>.

Huang, C. K., L. Zhan, Y. Ai et J. Jongstra. 1997. «LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils». *J Biol Chem.* vol. 272, no 1, p. 17-19. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8995217>.

Hunt, J. L. 2008. «Molecular testing in solid tumors: an overview». *Arch Pathol Lab Med.* vol. 132, no 2, p. 164-167. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18251569>.

Huot, J., F. Houle, D. R. Spitz et J. Landry. 1996. «HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress». *Cancer Res.* vol. 56, no 2, p. 273-279. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8542580>.

Hwang, C. S., M. H. Marymont et K. Muro. 2007. «Photon radiotherapy for the treatment of high-grade gliomas». *Expert Rev Anticancer Ther.* vol. 7, no 12 Suppl, p. S37-43. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18076317>.

Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono et Y. Gotoh. 1997. «Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways». *Science.* vol. 275, no 5296, p. 90-94. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8974401>.

Ide, T. 2006. «[Mechanism of cell proliferation--cell cycle, oncogenes, and senescence]». *Yakugaku Zasshi.* vol. 126, no 11, p. 1087-1115. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17077613>.

Iliakis, G., W. Wu et M. Wang. 2008. «DNA double strand break repair inhibition as a cause of heat radiosensitization: re-evaluation considering backup pathways of NHEJ». *Int J Hyperthermia.* vol. 24, no 1, p. 17-29. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18214766>.

Information Retrieval, Limited. 1980. «Carcinogenesis». *Carcinogenesis.*

Irigaray, P., J. A. Newby, R. Clapp, L. Hardell, V. Howard, L. Montagnier, S. Epstein et D. Belpomme. 2007. «Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview». *Biomed Pharmacother.* vol. 61, no 10, p. 640-658. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18055160>.

Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French et J. Tschopp. 1997. «Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP». *Nature.* vol. 388, no 6638, p. 190-195. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9217161>.

- Issels, R. D., M. Schlemmer et L. H. Lindner. 2006. «The role of hyperthermia in combined treatment in the management of soft tissue sarcoma». *Curr Oncol Rep.* vol. 8, no 4, p. 305-309. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17254531>.
- Iwadata, Y., J. Mizoe, Y. Osaka, A. Yamaura et H. Tsujii. 2001. «High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 50, no 3, p. 803-808. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11395250>.
- Iwasa, H., J. Han et F. Ishikawa. 2003. «Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway». *Genes Cells.* vol. 8, no 2, p. 131-144. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12581156>.
- Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki et M. Egeblad. 1998. «Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases». *Embo J.* vol. 17, no 21, p. 6124-6134. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9799222>.
- Jackson, A. L., et L. A. Loeb. 2001. «The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer». *Mutat Res.* vol. 477, no 1-2, p. 7-21. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11376682>.
- Jacquier-Sarlin, M. R., K. Fuller, A. T. Dinh-Xuan, M. J. Richard et B. S. Polla. 1994. «Protective effects of hsp70 in inflammation». *Experientia.* vol. 50, no 11-12, p. 1031-1038. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7988662>.
- Jakubczak, B., M. Wasik, K. Popkow et U. Demkow. 2006. «Kinetics of calcium ion concentration accompanying signal transduction in neutrophils from children with increased susceptibility to infections». *J Physiol Pharmacol.* vol. 57 Suppl 4, p. 131-137. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17072039>.
- Jiang, A., A. Craxton, T. Kurosaki et E. A. Clark. 1998. «Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase». *J Exp Med.* vol. 188, no 7, p. 1297-1306. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9763609>.

Jin, Z., et W. S. El-Deiry. 2005. «Overview of cell death signaling pathways». *Cancer Biol Ther.* vol. 4, no 2, p. 139-163. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15725726>.

Joffroy, S., N. Dourdin, J. P. Delage, P. Cottin, J. Koenig et J. J. Brustis. 2000. «M-calpain levels increase during fusion of myoblasts in the mutant muscular dysgenesis (mdg) mouse». *Int J Dev Biol.* vol. 44, no 4, p. 421-428. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10949052>.

Johnson, G. L., et K. Nakamura. 2007. «The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1773, no 8, p. 1341-1348. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17306896>.

Jolly, C., et R. I. Morimoto. 2000. «Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death». *J Natl Cancer Inst.* vol. 92, no 19, p. 1564-1572. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11018092>.

Juo, P., C. J. Kuo, S. E. Reynolds, R. F. Konz, J. Raingeaud, R. J. Davis, H. P. Biemann et J. Blenis. 1997. «Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases». *Mol Cell Biol.* vol. 17, no 1, p. 24-35. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8972182>.

Kamata, H., et H. Hirata. 1999. «Redox regulation of cellular signalling». *Cell Signal.* vol. 11, no 1, p. 1-14. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10206339>.

Kamisawa, T., Y. Tu, N. Egawa, A. Okamoto et T. Sasaki. 2006. «[Thermo-chemo-radiotherapy for advanced biliary carcinoma]». *Nippon Rinsho.* vol. 64 Suppl 1, p. 543-546. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16457322>.

Kampinga, H. H. 2006. «Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress». *Handb Exp Pharmacol.* no 172, p. 1-42. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16610353>.

Kampinga, H. H., J. F. Brunsting, G. J. Stege, P. W. Burgman et A. W. Konings. 1995. «Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins». *Exp Cell Res.* vol. 219, no 2, p. 536-546. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7641806>.

Kaneko, H., K. Igarashi, K. Kataoka et M. Miura. 2005. «Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 328, no 4, p. 1101-1106. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15707990>.

Kanfer, J. 1965. «Observations on Cerebroside Metabolism in Vivo». *J Biol Chem.* vol. 240, p. 609-612. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14275111>.

Kannan, K., et S. K. Jain. 2000. «Oxidative stress and apoptosis». *Pathophysiology.* vol. 7, no 3, p. 153-163. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10996508>.

Kantengwa, S., A. M. Capponi, J. V. Bonventre et B. S. Polla. 1990. «Calcium and the heat-shock response in the human monocytic line U-937». *Am J Physiol.* vol. 259, no 1 Pt 1, p. C77-83. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2196818>.

Kappelmayer, J., M. Udvardy et P. Antal-Szalmas. 2007. «Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia». *Curr Med Chem.* vol. 14, no 5, p. 519-530. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17346144>.

Karan, D., J. B. Thrasher et D. Lubaroff. 2008. «Prostate cancer: genes, environment, immunity and the use of immunotherapy». *Prostate Cancer Prostatic Dis.* En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18283297>.

Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein et R. W. Craig. 1991. «Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage». *Cancer Res.* vol. 51, no 23 Pt 1, p. 6304-6311. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1933891>.

Katavetin, P., K. Tungsanga, S. Eiam-Ong et M. Nangaku. 2007. «Antioxidative effects of erythropoietin». *Kidney Int Suppl*, no 107, p. S10-15. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17943138>.

Kato, Y., T. H. Chao, M. Hayashi, R. I. Tapping et J. D. Lee. 2000. «Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses». *Immunol Res*. vol. 21, no 2-3, p. 233-237. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10852122>.

Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch et J. D. Lee. 1997. «BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C». *Embo J*. vol. 16, no 23, p. 7054-7066. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384584>.

Kato, Y., R. I. Tapping, S. Huang, M. H. Watson, R. J. Ulevitch et J. D. Lee. 1998. «Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor». *Nature*. vol. 395, no 6703, p. 713-716. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9790194>.

Katschinski, D. M., H. I. Robins, M. Schad, S. Frede et J. Fandrey. 1999. «Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells». *Cancer Res*. vol. 59, no 14, p. 3404-3410. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10416602>.

Kaufman, R. J. 1999. «Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls». *Genes Dev*. vol. 13, no 10, p. 1211-1233. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10346810>.

Kaul, M., G. A. Garden et S. A. Lipton. 2001. «Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia». *Nature*. vol. 410, no 6831, p. 988-994. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11309629>.

Kavaikin, A. G. 2007. «[The current state of the problem of incompetence of esophageal anastomoses after operations for cancer of the esophagus and esophago-gastric passage]». *Vestn Khir Im I I Grek*. vol. 166, no 5, p. 107-110. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18154108>.

Kavurma, M. M., N. Figg, M. R. Bennett, J. Mercer, L. M. Khachigian et T. D. Littlewood. 2007. «Oxidative stress regulates IGF1R expression in vascular smooth-muscle cells via p53 and HDAC recruitment». *Biochem J.* vol. 407, no 1, p. 79-87. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17600529>.

Kawai, N., M. Futakuchi, T. Yoshida, A. Ito, S. Sato, T. Naiki, H. Honda, T. Shirai et K. Kohri. 2008. «Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone». *Prostate.* En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18302228>.

Kelekar, A., B. S. Chang, J. E. Harlan, S. W. Fesik et C. B. Thompson. 1997. «Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL». *Mol Cell Biol.* vol. 17, no 12, p. 7040-7046. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9372935>.

Kelly, K. J., R. M. Sandoval, K. W. Dunn, B. A. Molitoris et P. C. Dagher. 2003. «A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis». *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 284, no 5, p. C1309-1318. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676658>.

Kerr, J. F. 1971. «Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death». *J Pathol.* vol. 105, no 1, p. 13-20. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4108566>.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». *Br J Cancer.* vol. 26, no 4, p. 239-257. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4561027>.

Kesavan, K., K. Lobel-Rice, W. Sun, R. Lapadat, S. Webb, G. L. Johnson et T. P. Garrington. 2004. «MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts». *J Cell Physiol.* vol. 199, no 1, p. 140-148. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14978743>.

Khavari, T. A., et J. Rinn. 2007. «Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia». *Cell Cycle.* vol. 6, no 23, p. 2928-2931. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000402>.

Khoueir, Paul. 2004. «Effets des polyphénols du thé vert et de la radiothérapie sur la progression et la résistance tumorale dans un modèle in vivo de glioblastome». [Montréal], Université de Montréal.

Khoury, J. D. 2008. «Ewing sarcoma family of tumors: a model for the new era of integrated laboratory diagnostics». *Expert Rev Mol Diagn.* vol. 8, no 1, p. 97-105. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18088234>.

Khurana, S., M. L. Dubey et N. Malla. 2005. «Association of parasitic infections and cancers». *Indian J Med Microbiol.* vol. 23, no 2, p. 74-79. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15928434>.

Kiang, J. G., F. E. Carr, M. R. Burns et D. E. McClain. 1994. «HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP». *Am J Physiol.* vol. 267, no 1 Pt 1, p. C104-114. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8048473>.

Kiang, J. G., I. D. Gist et G. C. Tsokos. 1998. «Cytoprotection and regulation of heat shock proteins induced by heat shock in human breast cancer T47-D cells: role of $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinases». *Faseb J.* vol. 12, no 14, p. 1571-1579. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9806766>.

Kikumori, T., T. Kobayashi, M. Sawaki et T. Imai. 2008. «Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes». *Breast Cancer Res Treat.* En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18311580>.

Kim, H. J., E. J. Song et K. J. Lee. 2002. «Proteomic analysis of protein phosphorylations in heat shock response and thermotolerance». *J Biol Chem.* vol. 277, no 26, p. 23193-23207. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11886868>.

Kim, J., et R. P. Sharma. 2004. «Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages». *Toxicol Sci.* vol. 81, no 2, p. 518-527. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254339>.

Kim, P. K., Y. Wang, A. Gambotto, Y. M. Kim, R. Weller, B. S. Zuckerbraun, Y. Hua, S. C. Watkins et T. R. Billiar. 2002. «Hepatocyte Fas-associating death domain protein/mediator of

receptor-induced toxicity (FADD/MORT1) levels increase in response to pro-apoptotic stimuli». *J Biol Chem.* vol. 277, no 41, p. 38855-38862. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167637>.

Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami, Y. Uchida et K. Arihiro. 2006. «Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death». *J Pathol.* vol. 208, no 3, p. 319-326. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16261658>.

Kimura, Y., et M. Sumiyoshi. 2007. «High-fat, high-sucrose, and high-cholesterol diets accelerate tumor growth and metastasis in tumor-bearing mice». *Nutr Cancer.* vol. 59, no 2, p. 207-216. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18001216>.

King, C. H. 2006. «Long-term outcomes of school-based treatment for control of urinary schistosomiasis: a review of experience in Coast Province, Kenya». *Mem Inst Oswaldo Cruz.* vol. 101 Suppl 1, p. 299-306. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17308786>.

King, R. J. B. 1996. *Cancer biology*. Harlow, Essex, England: Longman.

Kirchhoff, S. R., S. Gupta et A. A. Knowlton. 2002. «Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury». *Circulation.* vol. 105, no 24, p. 2899-2904. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12070120>.

Klein, S. D., et B. Brune. 2002. «Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release». *Biochem J.* vol. 362, no Pt 3, p. 635-641. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11879190>.

Klionsky, D. J., A. M. Cuervo et P. O. Seglen. 2007. «Methods for monitoring autophagy from yeast to human». *Autophagy.* vol. 3, no 3, p. 181-206. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17224625>.

Klostergaard, J., M. E. Leroux, E. Auzenne, M. Khodadadian, W. Spohn, J. Y. Wu et N. J. Donato. 2006. «Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cells». *J Cell Biochem.* vol. 98, no 2, p. 356-369. En ligne.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

&list_uids=16440323 >.

Kohn, T., Y. Yamada, T. Hata, H. Mori, M. Yamamura, M. Tomonaga, Y. Urata, S. Goto et T. Kondo. 1996. «Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95(Fas/APO-1)-mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells». *J Immunol.* vol. 156, no 12, p. 4722-4728. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8648118>.

Kolesnick, R. N., et M. Kronke. 1998. «Regulation of ceramide production and apoptosis». *Annu Rev Physiol.* vol. 60, p. 643-665. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9558480>.

Kolettas, E., I. Skoufos, E. Kontargiris, S. Markopoulou, T. Tzavaras et E. S. Gonos. 2006. «Bcl-2 but not clusterin/apolipoprotein J protected human diploid fibroblasts and immortalized keratinocytes from ceramide-induced apoptosis: role of p53 in the ceramide response». *Arch Biochem Biophys.* vol. 445, no 1, p. 184-195. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16297852>.

Komichi, D., S. Tazuma, T. Nishioka, H. Hyogo et K. Chayama. 2005.

«Glycochenodeoxycholate plays a carcinogenic role in immortalized mouse cholangiocytes via oxidative DNA damage». *Free Radic Biol Med.* vol. 39, no 11, p. 1418-1427. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16274877>.

Komiyama, T., C. A. Ray, D. J. Pickup, A. D. Howard, N. A. Thornberry, E. P. Peterson et G. Salvesen. 1994. «Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition». *J Biol Chem.* vol. 269, no 30, p. 19331-19337. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8034697>.

Kondo, T., T. Matsuda, T. Kitano, A. Takahashi, M. Tashima, H. Ishikura, H. Umehara, N. Domae, T. Uchiyama et T. Okazaki. 2000. «Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 275, no 11, p. 7668-7676. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10713077>.

Konings, A. W., J. V. Hettinga et H. H. Kampinga. 1993. «Osteosarcoma in adolescents and young adults: new developments and controversies. Thermal chemosensitization of cDDP-resistant cells». *Cancer Treat Res.* vol. 62, p. 93-100. En ligne.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=8096764 >.

Korsmeyer, S. J., X. M. Yin, Z. N. Oltvai, D. J. Veis-Novack et G. P. Linette. 1995.
«Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1271, no 1, p. 63-66. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7599227>.

Koss, Amy Goldman. 2006. *Side effects*. New Milford, Conn.: Roaring Brook Press.

Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk et M. Gaestel. 1999. «MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis». *Nat Cell Biol*. vol. 1, no 2, p. 94-97. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10559880>.

Kouloulis, V. E., G. V. Koukourakis, A. K. Petridis, I. Kouvaris et A. D. Gouliamos. 2007.
«The efficacy of caelyx and hyperthermia for anticancer treatment». *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. vol. 2, no 3, p. 246-250. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18221068>.

Kouroku, Y., E. Fujita, K. Urase, T. Tsuru, R. Setsuie, T. Kikuchi, Y. Yagi, M. Y. Momoi et T. Momoi. 2000. «Caspases that are activated during generation of nuclear polyglutamine aggregates are necessary for DNA fragmentation but not sufficient for cell death». *J Neurosci Res*. vol. 62, no 4, p. 547-556. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11070498>.

Kozawa, O., et H. Tokuda. 2002. «[Heat shock protein 27 in osteoblasts]». *Nippon Yakurigaku Zasshi*. vol. 119, no 2, p. 89-94. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11862762>.

Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton et J. C. Reed. 1993.
«Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes». *Cancer Res*. vol. 53, no 19, p. 4701-4714. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8402648>.

Kralova, J., M. Dvorak, M. Koc et V. Kral. 2007. «p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative». *Oncogene*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18059338>.

Krebs, R. A., et M. E. Feder. 1997. «Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae». *Cell Stress Chaperones*. vol. 2, no 1, p. 60-71. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9250396>.

Kregel, K. C. 2002. «Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance». *J Appl Physiol*. vol. 92, no 5, p. 2177-2186. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11960972>.

Kretz-Remy, C., B. Munsch et A. P. Arrigo. 2001. «NFkappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex». *J Biol Chem*. vol. 276, no 47, p. 43723-43733. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11559696>.

Kristal, A. R., K. B. Arnold, J. M. Schenk, M. L. Neuhausser, P. Goodman, D. F. Penson et I. M. Thompson. 2008. «Dietary Patterns, Supplement Use, and the Risk of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial». *Am J Epidemiol*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18263602>.

Kroemer, G., et J. C. Reed. 2000. «Mitochondrial control of cell death». *Nat Med*. vol. 6, no 5, p. 513-519. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10802706>.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer et S. Kirchhoff. 2001. «Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex». *J Biol Chem*. vol. 276, no 23, p. 20633-20640. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11279218>.

Kuckleburg, C. J., R. Tiwari et C. J. Czuprynski. 2008. «Endothelial cell apoptosis induced by bacteria-activated platelets requires caspase-8 and -9 and generation of reactive oxygen species». *Thromb Haemost*. vol. 99, no 2, p. 363-372. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18278187>.

Kudo, T., S. Kanemoto, H. Hara, N. Morimoto, T. Morihara, R. Kimura, T. Tabira, K. Imaizumi et M. Takeda. 2008. «A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress». *Cell Death Differ*. vol. 15, no 2, p. 364-375. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

&list_uids=18049481 >.

Kuhl, N. M., J. Kunz et L. Rensing. 2000. «Heat shock-induced arrests in different cell cycle phases of rat C6-glioma cells are attenuated in heat shock-primed thermotolerant cells». *Cell Prolif.* vol. 33, no 3, p. 147-166. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10959624 >.

Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee et P. R. Young. 1997. «Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 235, no 3, p. 533-538. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207191 >.

Kummer, J. L., P. K. Rao et K. A. Heidenreich. 1997. «Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase». *J Biol Chem.* vol. 272, no 33, p. 20490-20494. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9252360 >.

Kurz, T., A. Terman et U. T. Brunk. 2007. «Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron». *Arch Biochem Biophys.* vol. 462, no 2, p. 220-230. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17306211 >.

Kvam, E., et D. S. Goldfarb. 2007. «Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*». *Autophagy.* vol. 3, no 2, p. 85-92. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17204844 >.

Kwon, D., C. Choi, J. Lee, K. O. Kim, J. D. Kim, S. J. Kim et I. H. Choi. 2001. «Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis». *J Neuroimmunol.* vol. 113, no 1, p. 1-9. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11137571 >.

Kyriakis, J. M., et J. Avruch. 1996. «Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines». *Bioessays.* vol. 18, no 7, p. 567-577. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8757935 >.

Lachapelle, G., S. M. Radicioni, A. R. Stankiewicz et D. D. Mosser. 2007. «Acute acidification or amiloride treatment suppresses the ability of Hsp70 to inhibit heat-induced apoptosis». *Apoptosis.* vol. 12, no 8, p. 1479-1488. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17431790>.

Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*. vol. 227, no 5259, p. 680-685. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063>.

Legendijk, J. J. 2000. «Hyperthermia treatment planning». *Phys Med Biol*. vol. 45, no 5, p. R61-76. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10843091>.

Lai, E., T. Teodoro et A. Volchuk. 2007. «Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response». *Physiology (Bethesda)*. vol. 22, p. 193-201. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17557940>.

Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe et P. Vandenabeele. 2007. «Caspases in cell survival, proliferation and differentiation». *Cell Death Differ*. vol. 14, no 1, p. 44-55. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17053807>.

Lamkanfi, M., M. Kalai et P. Vandenabeele. 2004. «Caspase-12: an overview». *Cell Death Differ*. vol. 11, no 4, p. 365-368. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14685161>.

Lamy, L. 1910. «Étude clinique et statistique de 134 cas de cancer de l'oesophage et du cardia. ». *Arch Mal Appar Digest*. vol. 4, p. 6.

Landry, J., P. Chretien, H. Lambert, E. Hickey et L. A. Weber. 1989. «Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells». *J Cell Biol*. vol. 109, no 1, p. 7-15. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2745558>.

Lao, Y., et D. C. Chang. 2007. «Study of the functional role of Bcl-2 family proteins in regulating Ca(2+) signals in apoptotic cells». *Biochem Soc Trans*. vol. 35, no Pt 5, p. 1038-1039. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17956272>.

Lara, M. F., et J. M. Paramio. 2007. «The Rb family connects with the Tp53 family in skin carcinogenesis». *Mol Carcinog*. vol. 46, no 8, p. 618-623. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17486638>.

Lattime, Edmund C., et Stanton L. Gerson. 1999. *Gene therapy of cancer : translational approaches from preclinical studies to clinical implementation*. San Diego: Academic Press.

Launay, S., O. Hermine, M. Fontenay, G. Kroemer, E. Solary et C. Garrido. 2005. «Vital functions for lethal caspases». *Oncogene*. vol. 24, no 33, p. 5137-5148. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079910>.

Lawler, S., A. Cuenda, M. Goedert et P. Cohen. 1997. «SKK4, a novel activator of stress-activated protein kinase-1 (SAPK1/JNK)». *FEBS Lett.* vol. 414, no 1, p. 153-158. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305750>.

Le Coz, Raymond. 2004. *Les médecins nestoriens au Moyen Age : les pratiques des Arabes*. Coll. «Comprendre le Moyen-Orient». Paris: Harmattan.

Le Dran, Henry-François, et Alexander Reid. 1766. *Consultations on most of the disorders that require the assistance of surgery*. London: Printed for Robert Horsfield ...

Le Pecq, Jean Bernard. 1978. *Chimiothérapie anticancéreuse : mécanismes d'action des substances antitumorales*. Coll. «Actualités scientifiques et industrielles, 1388». Paris: Hermann.

Lechner, C., M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Moller et A. Ullrich. 1996. «ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 93, no 9, p. 4355-4359. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8633070>.

Ledeon, R., et G. Wu. 2007. «GM1 in the nuclear envelope regulates nuclear calcium through association with a nuclear sodium-calcium exchanger». *J Neurochem*. vol. 103 Suppl 1, p. 126-134. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17986147>.

Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter et al. 1994. «A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis». *Nature*. vol. 372, no 6508, p. 739-746. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7997261>.

Lee, J. D., R. J. Ulevitch et J. Han. 1995. «Primary structure of BMK1: a new mammalian

map kinase». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 213, no 2, p. 715-724. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7646528 >.

Lee, M. A., R. C. Dunn, D. E. Clapham et L. Stehno-Bittel. 1998. «Calcium regulation of nuclear pore permeability». *Cell Calcium.* vol. 23, no 2-3, p. 91-101. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9601604 >.

Lee, W. K., B. Torchalski et F. Thevenod. 2007. «Cadmium-induced ceramide formation triggers calpain-dependent apoptosis in cultured kidney proximal tubule cells». *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 293, no 3, p. C839-847. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17596294 >.

Lee, Y. J., et A. A. Amoscato. 2004. «TRAIL and ceramide». *Vitam Horm.* vol. 67, p. 229-255. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15110180 >.

Leenman, E. E. 2007. «[Current views of the histogenesis and pathogenesis of Hodgkin lymphoma]». *Ark Patol.* vol. 69, no 5, p. 7-11. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18074812 >.

Lefferts, J. A., C. L. Bartels et G. J. Tsongalis. 2008. «Molecular oncology: current trends in diagnostics». *Future Oncol.* vol. 4, no 1, p. 61-70. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18241001 >.

Lei, K., et R. J. Davis. 2003. «JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 100, no 5, p. 2432-2437. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12591950 >.

Lei, X., S. Zhang, A. Bohrer, S. Bao, H. Song et S. Ramanadham. 2007. «The group VIA calcium-independent phospholipase A2 participates in ER stress-induced INS-1 insulinoma cell apoptosis by promoting ceramide generation via hydrolysis of sphingomyelins by neutral sphingomyelinase». *Biochemistry.* vol. 46, no 35, p. 10170-10185. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17685585 >.

Le-Niculescu, H., E. Bonfoco, Y. Kasuya, F. X. Claret, D. R. Green et M. Karin. 1999. «Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death». *Mol Cell Biol.* vol. 19, no 1, p. 751-763. En

ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9858598>.

Lepock, J. R. 2004. «Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization». *Int J Hyperthermia*. vol. 20, no 2, p. 115-130. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15195506>.

-----, 2005. «How do cells respond to their thermal environment?». *Int J Hyperthermia*. vol. 21, no 8, p. 681-687. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16338849>.

Lesser, Michael. 1987. *La thérapie des vitamines et de l'alimentation : pour retrouver son Â©quilibre*. Coll. «Collection Une approche holistique de la sante». Paris: Terre vivante.

Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy et D. L. George. 2004. «Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex». *Nat Cell Biol*. vol. 6, no 5, p. 443-450. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15077116>.

Levine, A. J. 1997. «p53, the cellular gatekeeper for growth and division». *Cell*. vol. 88, no 3, p. 323-331. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039259>.

Li, B., H. Yu, W. Zheng, R. Voll, S. Na, A. W. Roberts, D. A. Williams, R. J. Davis, S.

Ghosh et R. A. Flavell. 2000. «Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation». *Science*. vol. 288, no 5474, p. 2219-2222. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10864872>.

Li, J., B. Lee et A. S. Lee. 2006. «Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53». *J Biol Chem*. vol. 281, no 11, p. 7260-7270. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16407291>.

Li, J. H., J. Donovan, B. F. Sun et F. F. Liu. 1999. «Inhibition of protein kinase C activity promotes heat-induced apoptosis in RIF-1 but not in TR-4 cells». *Int J Radiat Biol*. vol. 75, no 7, p. 903-911. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10489902>.

Li, J. J., et L. W. Oberley. 1997. «Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia». *Cancer Res.* vol. 57, no 10, p. 1991-1998. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9157996>.

Li, P. F., R. Dietz et R. von Harsdorf. 1999. «p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2». *Embo J.* vol. 18, no 21, p. 6027-6036. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10545114>.

Li, W. H., Y. M. Lee, J. Y. Kim, S. Kang, S. Kim, K. H. Kim, C. H. Park et J. H. Chung. 2007. «Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Mediates Heat-Shock-Induced Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Epidermal Keratinocytes». *J Invest Dermatol.* En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17508023>.

Li, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch et J. Han. 1996. «The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 228, no 2, p. 334-340. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8920915>.

Lin, A. 2003. «Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis». *Bioessays.* vol. 25, no 1, p. 17-24. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12508278>.

Lin, A., et B. Dibling. 2002. «The true face of JNK activation in apoptosis». *Aging Cell.* vol. 1, no 2, p. 112-116. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12882340>.

Lin, A., A. Minden, H. Martinetto, F. X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G. L. Johnson et M. Karin. 1995. «Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2». *Science.* vol. 268, no 5208, p. 286-290. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7716521>.

Lin, G. D., D. Chattopadhyay, M. Maki, E. Takano, M. Hatanaka, L. DeLucas et S. V. Narayana. 1997. «Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant calcium-binding domain of the small subunit of porcine calpain». *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* vol. 53, no Pt 4, p. 474-476. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=15299918 >.

Liossis, S. N., X. Z. Ding, J. G. Kiang et G. C. Tsokos. 1997. «Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells». *J Immunol.* vol. 158, no 12, p. 5668-5675. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9190915 >.

Liotta, L. A. 1992. «Cancer cell invasion and metastasis». *Scientific American.* vol. 266, no 2, p. 54-59.

Liu, A. Y., H. S. Choi et M. S. Bae-Lee. 1990. «Decreased heat shock response upon adipose differentiation of 3T3-L1 cells». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 172, no 1, p. 1-7. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2222459 >.

Liu, B., K. W. Carle et R. L. Whisler. 1997. «Reductions in the activation of ERK and JNK are associated with decreased IL-2 production in T cells from elderly humans stimulated by the TCR/CD3 complex and costimulatory signals». *Cell Immunol.* vol. 182, no 2, p. 79-88. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9514699 >.

Liu, J., et A. Lin. 2005. «Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword». *Cell Res.* vol. 15, no 1, p. 36-42. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15686625 >.

Lloyd, H. H. 1975. «Estimation of tumor cell kill from Gompertz growth curves». *Cancer Chemother Rep.* vol. 59, no 2 Pt 1, p. 267-277. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1149006 >.

Locksley, R. M., N. Killeen et M. J. Lenardo. 2001. «The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology». *Cell.* vol. 104, no 4, p. 487-501. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11239407 >.

Lord-Fontaine, S., et D. A. Averill. 1999. «Enhancement of cytotoxicity of hydrogen peroxide by hyperthermia in chinese hamster ovary cells: role of antioxidant defenses». *Arch Biochem Biophys.* vol. 363, no 2, p. 283-295. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10068450 >.

Lord-Fontaine, S., et D. A. Averill-Bates. 2002. «Heat shock inactivates cellular antioxidant

defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose». *Free Radic Biol Med.* vol. 32, no 8, p. 752-765. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11937301>.

Loro, L., O. K. Vintermyr et A. C. Johannessen. 2005. «Apoptosis in normal and diseased oral tissues». *Oral Dis.* vol. 11, no 5, p. 274-287. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16120113>.

Louapre, P., J. F. Grongnet, R. M. Tanguay et J. C. David. 2005. «Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet heart at birth». *Cell Stress Chaperones.* vol. 10, no 1, p. 17-23. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15832944>.

Lu, N., H. Zhou, Y. H. Lin, Z. Q. Chen, Y. Pan et X. J. Li. 2007. «Oxidative stress mediates CoCl₂-induced prostate tumour cell adhesion: role of protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase». *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* vol. 101, no 1, p. 41-46. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17577315>.

Luch, Andreas. 2005. *The carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons*. London; Hackensack, NJ; London: Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Pub.

Ludewig, Burkhard, et Matthias W. Hoffmann. 2005. *Adoptive immunotherapy : methods and protocols*. Coll. «Methods in molecular medicine, 109». Totowa, N.J.: Humana Press.

Lui, J. C., et S. K. Kong. 2007. «Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis». *FEBS Lett.* vol. 581, no 1, p. 109-117. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17182042>.

Luk, S. C., S. W. Siu, C. K. Lai, Y. J. Wu et S. F. Pang. 2005. «Cell Cycle Arrest by a Natural Product via G2/M Checkpoint». *Int J Med Sci.* vol. 2, no 2, p. 64-69. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15968342>.

Lukas, R. V., A. Boire et M. K. Nicholas. 2007. «Emerging therapies for malignant glioma». *Expert Rev Anticancer Ther.* vol. 7, no 12 Suppl, p. S29-36. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18076315>.

MacCorkle, R. A., et T. H. Tan. 2005. «Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control». *Cell Biochem Biophys.* vol. 43, no 3, p. 451-461. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16244369>.

Macdonald, F., C. H. J. Ford et Alan G. Casson. 2003. *Molecular biology of cancer*. Coll. «Advanced text». Oxford: BIOS Scientific.

MacLennan, D. H., et S. R. Chen. 1993. «The role of the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in malignant hyperthermia». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 707, p. 294-304. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9137560>.

Madan, P., M. D. Calder et A. J. Watson. 2005. «Mitogen-activated protein kinase (MAPK) blockade of bovine preimplantation embryogenesis requires inhibition of both p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathways». *Reproduction.* vol. 130, no 1, p. 41-51. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15985630>.

Madej, P., Z. Antoszewski et J. A. Madej. 1995. «Ozonotherapy». *MATERIA MEDICA POLONA.* vol. 27, no 2, p. 53-56.

Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy et H. Saito. 1994. «A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast». *Nature.* vol. 369, no 6477, p. 242-245. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8183345>.

Maisin, J. H. 1966. *L'Union internationale contre le cancer; de sa fondation Ã nos jours*, International Union against Cancer. Genève: UICC.

Majno, G., et I. Joris. 1995. «Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death». *Am J Pathol.* vol. 146, no 1, p. 3-15. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7856735>.

Mak, N. K., R. N. Wong, K. N. Leung et M. Fung. 2002. «Involvement of tumor necrosis factor (TNF-alpha) in arsenic trioxide induced apoptotic cell death of murine myeloid leukemia cells». *Toxicol Lett.* vol. 135, no 1-2, p. 79-87. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12243866>.

Malayer, J. R., J. W. Pollard et P. J. Hansen. 1992. «Modulation of thermal killing of bovine lymphocytes and preimplantation mouse embryos by alanine and taurine». *Am J Vet Res.* vol. 53, no 5, p. 689-694. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=1524294 >.

Malisan, F., et R. Testi. 2002. «GD3 ganglioside and apoptosis». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1585, no 2-3, p. 179-187. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12531552 >.

Mallette, F. A., et G. Ferbeyre. 2007. «The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence». *Cell Cycle*. vol. 6, no 15, p. 1831-1836. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17671427 >.

Mancini, M., B. O. Anderson, E. Caldwell, M. Sedghinasab, P. B. Paty et D. M. Hockenbery. 1997. «Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line». *J Cell Biol*. vol. 138, no 2, p. 449-469. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9230085 >.

Mandic, A., K. Viktorsson, L. Strandberg, T. Heiden, J. Hansson, S. Linder et M. C. Shoshan. 2002. «Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis». *Mol Cell Biol*. vol. 22, no 9, p. 3003-3013. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11940658 >.

Manjili, M. H., X. Y. Wang, X. Chen, T. Martin, E. A. Repasky, R. Henderson et J. R. Subjeck. 2003. «HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice». *J Immunol*. vol. 171, no 8, p. 4054-4061. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14530326 >.

Manjili, M. H., X. Y. Wang, J. Park, I. J. Macdonald, Y. Li, R. C. A. A. Van Schie et J. R. Subjeck. 2002. «Cancer immunotherapy: stress proteins and hyperthermia». *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA*. vol. 18, p. 506-520.

Manser, E., C. Chong, Z. S. Zhao, T. Leung, G. Michael, C. Hall et L. Lim. 1995. «Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family». *J Biol Chem*. vol. 270, no 42, p. 25070-25078. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7559638 >.

Manskikh, V. N. 2007. «[Pathways of cell death and their biological importance]». *Tsitologiya*. vol. 49, no 11, p. 909-915. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>

&list_uids=18217357 >.

Marinissen, M. J., M. Chiariello et J. S. Gutkind. 2001. «Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway». *Genes Dev.* vol. 15, no 5, p. 535-553. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238375>.

Martin, G. A., G. Bollag, F. McCormick et A. Abo. 1995. «A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20». *Embo J.* vol. 14, no 9, p. 1970-1978. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7744004>.

Martin, S. J., et D. R. Green. 1995. «Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?». *Cell.* vol. 82, no 3, p. 349-352. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7634323>.

Martin, S. J., S. Takayama, A. J. McGahon, T. Miyashita, J. Corbeil, R. N. Kolesnick, J. C. Reed et D. R. Green. 1995. «Inhibition of ceramide-induced apoptosis by Bcl-2». *Cell Death Differ.* vol. 2, no 4, p. 253-257. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17180030>.

Massey, A. C., C. Zhang et A. M. Cuervo. 2006. «Chaperone-mediated autophagy in aging and disease». *Curr Top Dev Biol.* vol. 73, p. 205-235. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16782460>.

Massiello, A., A. Salas, R. L. Pinkerman, P. Roddy, J. R. Roesser et C. E. Chalfant. 2004. «Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide». *J Biol Chem.* vol. 279, no 16, p. 15799-15804. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14734550>.

Mathai, J. P., M. Germain et G. C. Shore. 2005. «BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death». *J Biol Chem.* vol. 280, no 25, p. 23829-23836. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15809295>.

Mathias, S., K. A. Dressler et R. N. Kolesnick. 1991. «Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 88, no 22, p. 10009-10013. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1946418>.

Mathias, S., et R. Kolesnick. 1993. «Ceramide: a novel second messenger». *Adv Lipid Res.* vol. 25, p. 65-90. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8368154>.

Mathias, S., L. A. Pena et R. N. Kolesnick. 1998. «Signal transduction of stress via ceramide». *Biochem J.* vol. 335 (Pt 3), p. 465-480. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9794783>.

Matsuki, S., Y. Iuchi, Y. Ikeda, I. Sasagawa, Y. Tomita et J. Fujii. 2003. «Suppression of cytochrome c release and apoptosis in testes with heat stress by minocycline». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 312, no 3, p. 843-849. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14680842>.

Matsumori, Y., S. M. Hong, K. Aoyama, Y. Fan, T. Kayama, R. A. Sheldon, Z. S. Vexler, D. M. Ferriero, P. R. Weinstein et J. Liu. 2005. «Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury». *J Cereb Blood Flow Metab.* vol. 25, no 7, p. 899-910. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15744251>.

Matsumoto, Y., N. Suzuki, K. Sakai, A. Morimatsu, K. Hirano et H. Murofushi. 1997. «A possible mechanism for hyperthermic radiosensitization mediated through hyperthermic lability of Ku subunits in DNA-dependent protein kinase». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 234, no 3, p. 568-572. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9175753>.

Matteucci, M. L., G. Anyarambhatla, G. Rosner, C. Azuma, P. E. Fisher, M. W. Dewhirst, D. Needham et D. E. Thrall. 2000. «Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas». *Clin Cancer Res.* vol. 6, no 9, p. 3748-3755. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10999769>.

Maulik, N., S. Goswami, N. Galang et D. K. Das. 1999. «Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kappaB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation». *FEBS Lett.* vol. 443, no 3, p. 331-336. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10025958>.

Maundrell, K., B. Antonsson, E. Magnenat, M. Camps, M. Muda, C. Chabert, C. Gillieron, U.

Boschert, E. Vial-Knecht, J. C. Martinou et S. Arkinstall. 1997. «Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1». *J Biol Chem.* vol. 272, no 40, p. 25238-25242. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9312139>.

McCarthy, Nicola. 2008. «Angiogenesis: Blood born killer?». *Nature reviews. Cancer.* vol. 8, no 3, p. 164.

McCollum, A. K., C. J. Teneyck, B. M. Sauer, D. O. Toft et C. Erlichman. 2006. «Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism». *Cancer Res.* vol. 66, no 22, p. 10967-10975. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17108135>.

McCubrey, J. A., W. S. May, V. Duronio et A. Mufson. 2000. «Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction». *Leukemia.* vol. 14, no 1, p. 9-21. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10637471>.

McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw et N. J. Holbrook. 2001. «Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state». *Mol Cell Biol.* vol. 21, no 4, p. 1249-1259. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11158311>.

McKee, A. E., et C. J. Thiele. 2006. «Targeting caspase 8 to reduce the formation of metastases in neuroblastoma». *Expert Opin Ther Targets.* vol. 10, no 5, p. 703-708. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16981827>.

McKinnell, Robert Gilmore. 1998. *The biological basis of cancer.* Cambridge; New York: Cambridge University Press.

McLaughlin, M. M., S. Kumar, P. C. McDonnell, S. Van Horn, J. C. Lee, G. P. Livi et P. R. Young. 1996. «Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase». *J Biol Chem.* vol. 271, no 14, p. 8488-8492. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8626550>.

Mehlen, P., E. Hickey, L. A. Weber et A. P. Arrigo. 1997. «Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells».

Biochem Biophys Res Commun. vol. 241, no 1, p. 187-192. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9405255>.

Mehlen, P., X. Preville, P. Chareyron, J. Briolay, R. Klemenz et A. P. Arrigo. 1995.
 «Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts». *J Immunol.* vol. 154, no 1, p. 363-374. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7995955>.

Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff et A. P. Arrigo. 1996. «Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death». *J Biol Chem.* vol. 271, no 28, p. 16510-16514. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8663291>.

Mehta, P. B., B. L. Jenkins, L. McCarthy, L. Thilak, C. N. Robson, D. E. Neal et H. Y. Leung. 2003. «MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion». *Oncogene.* vol. 22, no 9, p. 1381-1389. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12618764>.

Meldrum, D. R., C. A. Dinarello, J. C. Cleveland, Jr., B. S. Cain, B. D. Shames, X. Meng et A. H. Harken. 1998. «Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism». *Surgery.* vol. 124, no 2, p. 291-296; discussion 297. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9706151>.

Meloche, S., B. G. Beatty et J. Pellerin. 1996. «Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3». *Oncogene.* vol. 13, no 7, p. 1575-1579. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8875998>.

Meloche, S., et J. Pouyssegur. 2007. «The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition». *Oncogene.* vol. 26, no 22, p. 3227-3239. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17496918>.

Menabde, G. T., N. D. Natroshvili et T. D. Natroshvili. 2006. «[Ozonotherapy for the treatment of parodontitis]». *Georgian medical news*, no 134, p. 43-46.

Mendelsohn, John. 1995. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders.

Meriin, A. B., J. A. Yaglom, V. L. Gabai, L. Zon, S. Ganiatsas, D. D. Mosser, L. Zon et M. Y. Sherman. 1999. «Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72». *Mol Cell Biol.* vol. 19, no 4, p. 2547-2555. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10082520>.

Mertens, S., M. Craxton et M. Goedert. 1996. «SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases». *FEBS Lett.* vol. 383, no 3, p. 273-276. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8925912>.

Meyer, J. L., L. Verhey, P. Xia et J. Wong. 2007. «New technologies in the radiotherapy clinic». *Front Radiat Ther Oncol.* vol. 40, p. 1-17. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17641499>.

Michel, C., et G. van Echten-Deckert. 1997. «Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum». *FEBS Lett.* vol. 416, no 2, p. 153-155. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9369202>.

Michel, C., G. van Echten-Deckert, J. Rother, K. Sandhoff, E. Wang et A. H. Merrill, Jr.

1997. «Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide». *J Biol Chem.* vol. 272, no 36, p. 22432-22437. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9312549>.

Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska et U. M. Moll. 2003. «p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria». *Mol Cell.* vol. 11, no 3, p. 577-590. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12667443>.

Mihara, M., et U. M. Moll. 2003. «Detection of mitochondrial localization of p53». *Methods Mol Biol.* vol. 234, p. 203-209. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12824533>.

Mikkelsen, R. B., L. Reinlib, M. Donowitz et D. Zahniser. 1991. «Hyperthermia effects on cytosolic [Ca²⁺]: analysis at the single cell level by digitized imaging microscopy and cell survival». *Cancer Res.* vol. 51, no 1, p. 359-364. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1988097>.

Milleron, R. S., et S. B. Bratton. 2006. «Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex». *J Biol Chem.* vol. 281, no 25, p. 16991-17000. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16618700>.

-----, 2007. «'Heated' Debates in Apoptosis». *Cell Mol Life Sci.* En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17572850>.

Minagawa, N., E. A. Kruglov, J. A. Dranoff, M. E. Robert, G. J. Gores et M. H. Nathanson. 2005. «The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca²⁺ signals». *J Biol Chem.* vol. 280, no 39, p. 33637-33644. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16027162>.

Missiaen, L., K. Van Acker, K. Van Baelen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, J. B. Parys, H. De Smedt, J. Vanoevelen, L. Dode, R. Rizzuto et G. Callewaert. 2004. «Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments». *Cell Calcium.* vol. 36, no 6, p. 479-487. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15488597>.

Miyakoda, M., K. Nakahata, K. Suzuki, S. Kodama et M. Watanabe. 1999. «Heat-induced G1 arrest is dependent on p53 function but not on RB dephosphorylation». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 266, no 2, p. 377-381. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10600511>.

Miyakoda, M., K. Suzuki, S. Kodama et M. Watanabe. 2002. «Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock». *Oncogene.* vol. 21, no 7, p. 1090-1096. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11850826>.

Mohamad, N., A. Gutierrez, M. Nunez, C. Cocca, G. Martin, G. Cricco, V. Medina, E. Rivera et R. Bergoc. 2005. «Mitochondrial apoptotic pathways». *Biocell.* vol. 29, no 2, p. 149-161. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16187493>.

Mohamed, F., O. A. Stuart, O. Glehen, M. Urano et P. H. Sugarbaker. 2006. «Optimizing the factors which modify thermal enhancement of melphalan in a spontaneous murine tumor». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 58, no 6, p. 719-724. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16614851>.

Moldoveanu, T., C. M. Hosfield, D. Lim, J. S. Elce, Z. Jia et P. L. Davies. 2002. «A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain». *Cell*. vol. 108, no 5, p. 649-660. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893336>.

Moll, U. M., N. Marchenko et X. K. Zhang. 2006. «p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction». *Oncogene*. vol. 25, no 34, p. 4725-4743. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16892086>.

Moll, U. M., et N. Slade. 2004. «p63 and p73: roles in development and tumor formation». *Mol Cancer Res*. vol. 2, no 7, p. 371-386. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15280445>.

Molnar, A., A. M. Theodoras, L. I. Zon et J. M. Kyriakis. 1997. «Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK». *J Biol Chem*. vol. 272, no 20, p. 13229-13235. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9148940>.

Momoi, T. 2004. «Caspases involved in ER stress-mediated cell death». *J Chem Neuroanat*. vol. 28, no 1-2, p. 101-105. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15363495>.

Monaghan, T. K., C. J. Mackenzie, R. Plevin et E. M. Lutz. 2008. «PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases». *J Neurochem*. vol. 104, no 1, p. 74-88. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17995938>.

Moriguchi, T., F. Toyoshima, N. Masuyama, H. Hanafusa, Y. Gotoh et E. Nishida. 1997. «A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses». *Embo J*. vol. 16, no 23, p. 7045-7053. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384583>.

Morimoto, T., M. D. Ginsberg, W. D. Dietrich et W. Zhao. 1997. «Hyperthermia enhances spectrin breakdown in transient focal cerebral ischemia». *Brain Res*. vol. 746, no 1-2, p. 43-51. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=9037482 >.

Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata et Y. Yasuhiko. 2002. «An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12». *J Biol Chem.* vol. 277, no 37, p. 34287-34294. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12097332 >.

Morishima, N., K. Nakanishi, K. Tsuchiya, T. Shibata et E. Seiwa. 2004. «Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 279, no 48, p. 50375-50381. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15452118 >.

Moriyama-Gonda, N., M. Igawa, H. Shiina, S. Urakami, Y. Wada et M. Terashima. 2000. «Heat-induced cellular damage and tolerance in combination with adriamycin for the PC-3 prostate cancer cell line: relationships with cytotoxicity, reactive oxygen species and heat shock protein 70 expression». *Eur Urol.* vol. 38, no 2, p. 235-240. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10895018 >.

Mortaz, E., F. A. Redegeld, M. W. van der Heijden, H. R. Wong, F. P. Nijkamp et F. Engels. 2005. «Mast cell activation is differentially affected by heat shock». *Exp Hematol.* vol. 33, no 8, p. 944-952. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16038788 >.

Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, C. Denis-Larose et B. Massie. 1997. «Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis». *Mol Cell Biol.* vol. 17, no 9, p. 5317-5327. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9271409 >.

Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto et B. Massie. 2000. «The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis». *Mol Cell Biol.* vol. 20, no 19, p. 7146-7159. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10982831 >.

Mosser, D. D., P. T. Kotzbauer, K. D. Sarge et R. I. Morimoto. 1990. «In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 87, no 10, p. 3748-3752. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation> >.

&list_uids=2339118 >.

Mosser, D. D., et L. H. Martin. 1992. «Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line». *J Cell Physiol.* vol. 151, no 3, p. 561-570. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1295903 >.

Moulin, M., C. Dumontet et A. P. Arrigo. 2007. «Sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by hyperthermia». *Cancer Lett.* vol. 250, no 1, p. 117-127. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17141951 >.

Moyen, C., S. Goudenege, S. Poussard, A. H. Sassi, J. J. Brustis et P. Cottin. 2004. «Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation». *Int J Biochem Cell Biol.* vol. 36, no 4, p. 728-743. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15010335 >.

Mulloy, R., S. Salinas, A. Philips et R. A. Hipskind. 2003. «Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade». *Oncogene.* vol. 22, no 35, p. 5387-5398. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12934098 >.

Murtha-Riel, P., M. V. Davies, B. J. Scherer, S. Y. Choi, J. W. Hershey et R. J. Kaufman. 1993. «Expression of a phosphorylation-resistant eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit mitigates heat shock inhibition of protein synthesis». *J Biol Chem.* vol. 268, no 17, p. 12946-12951. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8509427 >.

Nair, V. D., K. S. McNaught, J. Gonzalez-Maeso, S. C. Sealfon et C. W. Olanow. 2006. «p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition». *J Biol Chem.* vol. 281, no 51, p. 39550-39560. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17060322 >.

Nakagawa, T., et J. Yuan. 2000. «Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis». *J Cell Biol.* vol. 150, no 4, p. 887-894. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10953012 >.

Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner et J. Yuan. 2000. «Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta». *Nature.* vol. 403, no 6765, p. 98-103. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10638761>.

Nakajima, A., Y. Kojima, M. Nakayama, H. Yagita, K. Okumura et H. Nakano. 2008. «Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent JNK activation and reactive oxygen species accumulation in tumor cells». *Oncogene*. vol. 27, no 1, p. 76-84. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17599041>.

Nakajima, M. 2007. «Smoking behavior and related cancers: the role of CYP2A6 polymorphisms». *Curr Opin Mol Ther*. vol. 9, no 6, p. 538-544. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18041664>.

Nakamura, K., et G. L. Johnson. 2003. «PBI domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PBI domain for activation of the ERK5 pathway». *J Biol Chem*. vol. 278, no 39, p. 36989-36992. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12912994>.

Natale, D. R., A. J. Paliga, F. Beier, S. J. D'Souza et A. J. Watson. 2004. «p38 MAPK signaling during murine preimplantation development». *Dev Biol*. vol. 268, no 1, p. 76-88. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15031106>.

Negri, S., A. Oberson, M. Steinmann, C. Sauser, P. Nicod, G. Waeber, D. F. Schorderet et C. Bonny. 2000. «cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK-interacting protein». *Genomics*. vol. 64, no 3, p. 324-330. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10756100>.

New, L., Y. Jiang, M. Zhao, K. Liu, W. Zhu, L. J. Flood, Y. Kato, G. C. Parry et J. Han. 1998. «PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase». *Embo J*. vol. 17, no 12, p. 3372-3384. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9628874>.

Nguyen, A. N., et K. Shiozaki. 1999. «Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases». *Genes Dev*. vol. 13, no 13, p. 1653-1663. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10398679>.

Nguyen, M., P. E. Branton, P. A. Walton, Z. N. Oltvai, S. J. Korsmeyer et G. C. Shore. 1994. «Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-

defective adenovirus». *J Biol Chem.* vol. 269, no 24, p. 16521-16524. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8206964>.

Nickson, P., A. Toth et P. Erhardt. 2007. «PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress». *Cardiovasc Res.* vol. 73, no 1, p. 48-56. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17107669>.

Nicol, R. L., N. Frey, G. Pearson, M. Cobb, J. Richardson et E. N. Olson. 2001. «Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy». *Embo J.* vol. 20, no 11, p. 2757-2767. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11387209>.

Nishikawa, M., A. Myoui, T. Tomita, K. Takahi, A. Nampei et H. Yoshikawa. 2007. «[p38 MAP Kinase inhibitor]». *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* vol. 30, no 5, p. 390-397. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17984579>.

Nishina, H., K. D. Fischer, L. Radvanyi, A. Shahinian, R. Hakem, E. A. Rubie, A. Bernstein, T. W. Mak, J. R. Woodgett et J. M. Penninger. 1997. «Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3». *Nature.* vol. 385, no 6614, p. 350-353. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9002521>.

Nishita, M., S. Inoue, M. Tsuda, C. Tateda et T. Miyashita. 1998. «Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia». *Exp Cell Res.* vol. 244, no 1, p. 357-366. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9770379>.

Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka et H. Ichijo. 2002. «ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats». *Genes Dev.* vol. 16, no 11, p. 1345-1355. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12050113>.

Nithipongvanitch, R., W. Ittarat, M. P. Cole, J. Tangpong, D. K. Clair et T. D. Oberley. 2007. «Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin)?». *Antioxid Redox Signal.* vol. 9, no 7, p. 1001-1008. En ligne.
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=17508921 >.

Nitta, M., H. Okamura, S. Aizawa et M. Yamaizumi. 1997. «Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S». *Oncogene*. vol. 15, no 5, p. 561-568. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9247309>.

Oakes, S. A., J. T. Opferman, T. Pozzan, S. J. Korsmeyer et L. Scorrano. 2003. «Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members». *Biochem Pharmacol*. vol. 66, no 8, p. 1335-1340. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14555206>.

O'Connor, R. 1998. «Survival factors and apoptosis». *Adv Biochem Eng Biotechnol*. vol. 62, p. 137-166. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9755644>.

Oesterreich, S., E. Hickey, L. A. Weber et S. A. Fuqua. 1996. «Basal regulatory promoter elements of the hsp27 gene in human breast cancer cells». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 222, no 1, p. 155-163. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8630062>.

Oesterreich, S., C. N. Weng, M. Qiu, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne et S. A. Fuqua. 1993. «The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines». *Cancer Res*. vol. 53, no 19, p. 4443-4448. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8402609>.

Ogura, M., et M. Kitamura. 1998. «Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase». *J Immunol*. vol. 161, no 7, p. 3569-3574. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759878>.

Oh, H. J., X. Chen et J. R. Subjeck. 1997. «Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance». *J Biol Chem*. vol. 272, no 50, p. 31636-31640. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9395504>.

Ohnishi, T. 2005. «The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia». *J Cancer Res Ther*. vol. 1, no 3, p. 147-150. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17998646>.

Ohnishi, T., H. Matsumoto, A. Takahashi, M. Shimura et H. J. Majima. 1995. «Accumulation of mutant p53 and hsp72 by heat treatment, and their association in a human glioblastoma cell line». *Int J Hyperthermia*. vol. 11, no 5, p. 663-671. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7594817>.

Ohnishi, T., X. Wang, K. Ohnishi, H. Matsumoto et A. Takahashi. 1996. «p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells». *J Biol Chem*. vol. 271, no 24, p. 14510-14513. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662996>.

Ohno, S., Y. Emori, S. Imajoh, H. Kawasaki, M. Kisaragi et K. Suzuki. 1984. «Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein?». *Nature*. vol. 312, no 5994, p. 566-570. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6095110>.

Ohtsubo, T., H. Igawa, T. Saito, H. Matsumoto, H. Park, C. W. Song, E. Kano et H. Saito. 2001. «Enhancement of cell killing by induction of apoptosis after treatment with mild hyperthermia at 42 degrees C and cisplatin». *Radiat Res*. vol. 156, no 1, p. 103-109. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11418078>.

Okoshi, R., T. Ozaki, H. Yamamoto, K. Ando, N. Koida, S. Ono, T. Koda, T. Kamijo, A. Nakagawara et H. Kizaki. 2007. «Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress». *J Biol Chem*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18056705>.

Okuno, S., A. Saito, T. Hayashi et P. H. Chan. 2004. «The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia». *J Neurosci*. vol. 24, no 36, p. 7879-7887. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15356200>.

Old, L. J. 1996. «Immunotherapy for Cancer». *SCIENTIFIC AMERICAN -AMERICAN EDITION-*. vol. 275, no 3, p. 136-143.

Olson, James Stuart. 1989. *The history of cancer : an annotated bibliography*. Coll. «Bibliographies and indexes in medical studies, no. 3». New York: Greenwood Press.

Onuigbo, W. I. 1962. «Historical trends in cancer surgery». *Medical history*. vol. 6, p. 154-161.

Orrenius, S. 2007. «Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death». *Drug Metab Rev.* vol. 39, no 2-3, p. 443-455. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17786631>.

Ostberg, J. R., K. C. Kaplan et E. A. Repasky. 2002. «Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia». *Int J Hyperthermia.* vol. 18, no 6, p. 552-562. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12537754>.

Ostberg, J. R., et E. A. Repasky. 2006. «Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function». *Cancer Immunol Immunother.* vol. 55, no 3, p. 292-298. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15864585>.

Otterbein, L. E., M. P. Soares, K. Yamashita et F. H. Bach. 2003. «Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme». *Trends Immunol.* vol. 24, no 8, p. 449-455. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12909459>.

Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer et D. B. Donner. 1999. «NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase». *Nature.* vol. 401, no 6748, p. 82-85. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10485710>.

Pagliari, L. J., T. Kuwana, C. Bonzon, D. D. Newmeyer, S. Tu, H. M. Beere et D. R. Green. 2005. «The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 102, no 50, p. 17975-17980. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16330765>.

Pandey, P., R. Farber, A. Nakazawa, S. Kumar, A. Bharti, C. Nalin, R. Weichselbaum, D. Kufe et S. Kharbanda. 2000. «Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3». *Oncogene.* vol. 19, no 16, p. 1975-1981. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10803458>.

Pandey, P., A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe et S. Kharbanda. 2000. «Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90». *Embo J.* vol. 19, no 16, p. 4310-4322. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10944114>.

Park, H. S., J. S. Lee, S. H. Huh, J. S. Seo et E. J. Choi. 2001. «Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase». *Embo J.* vol. 20, no 3, p. 446-456. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11157751>.

Park, K. C., D. S. Kim, H. O. Choi, K. H. Kim, J. H. Chung, H. C. Eun, J. S. Lee et J. S. Seo. 2000. «Overexpression of HSP70 prevents ultraviolet B-induced apoptosis of a human melanoma cell line». *Arch Dermatol Res.* vol. 292, no 10, p. 482-487. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11142769>.

Parker, C. G., J. Hunt, K. Diener, M. McGinley, B. Soriano, G. A. Keesler, J. Bray, Z. Yao, X. S. Wang, T. Kohno et H. S. Lichenstein. 1998. «Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 249, no 3, p. 791-796. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9731215>.

Parsell, D. A., et S. Lindquist. 1993. «The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins». *Annu Rev Genet.* vol. 27, p. 437-496. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8122909>.

Parsell, D. A., et R. T. Sauer. 1989. «Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in Escherichia coli: dependence on protein level not protein degradation». *Genes Dev.* vol. 3, no 8, p. 1226-1232. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2676724>.

Paschen, W. 2004. «Endoplasmic reticulum dysfunction in brain pathology: critical role of protein synthesis». *Curr Neurovasc Res.* vol. 1, no 2, p. 173-181. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16185192>.

Patel, M., et B. J. Day. 1999. «Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants». *Trends Pharmacol Sci.* vol. 20, no 9, p. 359-364. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10462758>.

Patel, T., G. J. Gores et S. H. Kaufmann. 1996. «The role of proteases during apoptosis». *Faseb J.* vol. 10, no 5, p. 587-597. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8621058>.

Paul, C., F. Manero, S. Gonin, C. Kretz-Remy, S. Viro et A. P. Arrigo. 2002. «Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release». *Mol Cell Biol.* vol. 22, no 3, p. 816-834. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11784858>.

Paumen, M. B., Y. Ishida, M. Muramatsu, M. Yamamoto et T. Honjo. 1997. «Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 272, no 6, p. 3324-3329. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9013572>.

Pearl, L. H., et C. Prodromou. 2000. «Structure and in vivo function of Hsp90». *Curr Opin Struct Biol.* vol. 10, no 1, p. 46-51. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10679459>.

Peharda, V., F. Gruber, M. Kastelan, L. P. Massari, M. Saftic, L. Cabrijan et G. Zamolo. 2007. «Occupational skin diseases caused by solar radiation». *Coll Antropol.* vol. 31 Suppl 1, p. 87-90. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17469759>.

Pei, Y., D. Xing, X. Gao, L. Liu et T. Chen. 2007. «Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis». *Apoptosis.* vol. 12, no 9, p. 1681-1690. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17520191>.

Pelucchi, C., S. Gallus, W. Garavello, C. Bosetti et C. La Vecchia. 2006. «Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver». *Alcohol Res Health.* vol. 29, no 3, p. 193-198. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17373408>.

Peng, X., J. M. Angelastro et L. A. Greene. 1996. «Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors». *J Neurochem.* vol. 66, no 3, p. 1191-1197. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8769883>.

Perander, M., E. Aberg, B. Johansen, B. Dreyer, I. J. Guldvik, H. Outzen, S. M. Keyse et O. M. Seternes. 2008. «The Serine 186 phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5». *Biochem J.* En ligne.
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=18248330 >.

Pereira, D. B., A. P. Carvalho et C. B. Duarte. 2002. «Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes». *Neuropharmacology*. vol. 42, no 1, p. 9-19. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11750912 >.

Perez-Tomas, R. 2006. «Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment». *Curr Med Chem*. vol. 13, no 16, p. 1859-1876. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16842198 >.

Perrot, Serge. 2007. *ThÃ©rapeutique pratique 2007*. Paris: Med-Line.

Perry, D. K., J. Carton, A. K. Shah, F. Meredith, D. J. Uhlinger et Y. A. Hannun. 2000. «Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis». *J Biol Chem*. vol. 275, no 12, p. 9078-9084. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10722759 >.

Persing, D. H., et F. G. Prendergast. 1999. «Infection, immunity, and cancer». *Archives of pathology & laboratory medicine*. vol. 123, no 11, p. 1015-1022.

Peták, I., et J. A. Houghton. 2001. «Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy». *Pathol Oncol Res*. vol. 7, no 2, p. 95-106. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11458271 >.

Petros, A. M., A. Gunasekera, N. Xu, E. T. Olejniczak et S. W. Fesik. 2004. «Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR». *FEBS Lett*. vol. 559, no 1-3, p. 171-174. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14960327 >.

Pi, X., C. Yan et B. C. Berk. 2004. «Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis». *Circ Res*. vol. 94, no 3, p. 362-369. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14670836 >.

Pillaire, M. J., A. R. Nebreda et J. M. Darbon. 2000. «Cisplatin and UV radiation induce activation of the stress-activated protein kinase p38gamma in human melanoma cells». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 278, no 3, p. 724-728. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11095975 >.

Pimienta, G., et J. Pascual. 2007. «Canonical and alternative MAPK signaling». *Cell Cycle*. vol. 6, no 21, p. 2628-2632. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17957138 >.

Pinton, P., et R. Rizzuto. 2006. «Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum». *Cell Death Differ.* vol. 13, no 8, p. 1409-1418. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16729032 >.

Plo, I., S. Ghandour, A. C. Feutz, M. Clanet, G. Laurent et A. Bettaieb. 1999. «Involvement of de novo ceramide biosynthesis in lymphotoxin-induced oligodendrocyte death». *Neuroreport*. vol. 10, no 11, p. 2373-2376. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10439466 >.

Pocock, J. M., et A. C. Liddle. 2001. «Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease». *Prog Brain Res.* vol. 132, p. 555-565. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11545020 >.

Podrabsky, J. E., et G. N. Somero. 2007. «An inducible 70 kDa-class heat shock protein is constitutively expressed during early development and diapause in the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*». *Cell Stress Chaperones*. vol. 12, no 3, p. 199-204. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17915551 >.

Poe, B. S., et K. L. O'Neill. 1997. «Inhibition of protein synthesis sensitizes thermotolerant cells to heat shock induced apoptosis». *Apoptosis*. vol. 2, no 6, p. 510-517. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14646522 >.

Polanowska-Grabowska, R., C. G. Simon, Jr., R. Falchetto, J. Shabanowitz, D. F. Hunt et A. R. Gear. 1997. «Platelet adhesion to collagen under flow causes dissociation of a phosphoprotein complex of heat-shock proteins and protein phosphatase 1». *Blood*. vol. 90, no 4, p. 1516-1526. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9269769 >.

Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler et B. Vogelstein. 1997. «A model for p53-induced apoptosis». *Nature*. vol. 389, no 6648, p. 300-305. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305847 >.

Porcelli, A. M., A. Ghelli, L. Iommarini, E. Mariani, M. Hoque, C. Zanna, G. Gasparre et M. Rugolo. 2008. «The antioxidant function of Bcl-2 preserves cytoskeletal stability of cells

with defective respiratory complex I». *Cell Mol Life Sci.* vol. 65, no 18, p. 2943-2951. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18695940>.

Porebska, I., E. Wyrodek, M. Kosacka, J. Adamiak, R. Jankowska et A. Harlozinska-Szmyrka. 2006. «Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer». *In Vivo.* vol. 20, no 5, p. 599-604. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17091766>.

Porn-Ares, M. I., A. Samali et S. Orrenius. 1998. «Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis». *Cell Death Differ.* vol. 5, no 12, p. 1028-1033. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9894609>.

Potapova, O., S. V. Anisimov, M. Gorospe, R. H. Dougherty, W. A. Gaarde, K. R. Boheler et N. J. Holbrook. 2002. «Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression». *Cancer Res.* vol. 62, no 11, p. 3257-3263. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12036942>.

Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe et J. Meldolesi. 1994. «Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores». *Physiol Rev.* vol. 74, no 3, p. 595-636. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8036248>.

Prichett, G., H. J. Cohen, K. M. Rao, F. Cobb, M. Sullivan et M. S. Currie. 1995. «Tumor necrosis factor, natural killer activity and other measures of immune function and inflammation in elderly men with heart failure». *Gerontology.* vol. 41, no 1, p. 45-56. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7737534>.

Pritchard, Michele T., et N. Y. Health Research Inc Buffalo. «The Preclinical Evaluation of Fever-Range, Whole Body Hyperthermia as a Adjuvant to Chemotherapy and Cytokine Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer». Defense Technical Information Center. En ligne. <<http://handle.dtic.mil/100.2/ADA407467>>.

Przybytkowski, E., J. H. Bates, D. A. Bates et W. J. Mackillop. 1986. «Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins». *Radiat Res.* vol. 107, no 3, p. 317-331. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3749466>.

Pugazhenth, S., A. Nesterova, C. Sable, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, L. E. Heasley et J. E. Reusch. 2000. «Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein». *J Biol Chem.* vol. 275, no 15, p. 10761-10766. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10753867>.

Qian, L., X. Song, H. Ren, J. Gong et S. Cheng. 2004. «Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte». *Cell Stress Chaperones.* vol. 9, no 3, p. 281-293. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15544166>.

Raaphorst, G. P., M. M. Feeley, G. L. Chu et W. C. Dewey. 1993. «A comparison of the enhancement of radiation sensitivity and DNA polymerase inactivation by hyperthermia in human glioma cells». *Radiat Res.* vol. 134, no 3, p. 331-336. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8316626>.

Radford, E. P., et E. A. Martell. 1975. «Polonium-210: lead-210 ratios as an index of residence times of insoluble particles from cigarette smoke in bronchial epithelium». *Inhaled Part.* vol. 4 Pt 2, p. 567-581. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1236240>.

Rai, N. K., K. Tripathi, D. Sharma et V. K. Shukla. 2005. «Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing». *Int J Low Extrem Wounds.* vol. 4, no 3, p. 138-144. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16100094>.

Raingaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch et R. J. Davis. 1995. «Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine». *J Biol Chem.* vol. 270, no 13, p. 7420-7426. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7535770>.

Rane, M. J., P. Y. Coxon, D. W. Powell, R. Webster, J. B. Klein, W. Pierce, P. Ping et K. R. McLeish. 2001. «p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils». *J Biol Chem.* vol. 276, no 5, p. 3517-3523. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11042204>.

Rane, M. J., Y. Pan, S. Singh, D. W. Powell, R. Wu, T. Cummins, Q. Chen, K. R. McLeish et J. B. Klein. 2003. «Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation». *J Biol Chem.* vol. 278, no 30, p. 27828-27835. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12740362>.

Rao, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby et D. E. Bredesen. 2001. «Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation». *J Biol Chem.* vol. 276, no 36, p. 33869-33874. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11448953>.

Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maisse, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J. M. Penninger, C. Garrido et G. Kroemer. 2001. «Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor». *Nat Cell Biol.* vol. 3, no 9, p. 839-843. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11533664>.

Repici, M., C. Centeno, S. Tomasi, G. Forloni, C. Bonny, A. Vercelli et T. Borsello. 2007. «Time-course of c-Jun N-terminal kinase activation after cerebral ischemia and effect of D-JNKI1 on c-Jun and caspase-3 activation». *Neuroscience.* vol. 150, no 1, p. 40-49. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17900813>.

Richter, K., J. Reinstein et J. Buchner. 2007. «A Grp on the Hsp90 mechanism». *Mol Cell.* vol. 28, no 2, p. 177-179. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17964255>.

Rincon, M. 2001. «MAP-kinase signaling pathways in T cells». *Curr Opin Immunol.* vol. 13, no 3, p. 339-345. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11406366>.

Rippo, M. R., F. Malisan, L. Ravagnan, B. Tomassini, I. Condo, P. Costantini, S. A. Susin, A. Rufini, M. Todaro, G. Kroemer et R. Testi. 2000. «GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion». *Faseb J.* vol. 14, no 13, p. 2047-2054. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11023989>.

Rizzuto, R., et T. Pozzan. 2006. «Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences». *Physiol Rev.* vol. 86, no 1, p. 369-408. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16371601>.

Robinson, M. J., B. E. Xu Be, S. Stippec et M. H. Cobb. 2002. «Different domains of the mitogen-activated protein kinases ERK3 and ERK2 direct subcellular localization and upstream specificity in vivo». *J Biol Chem.* vol. 277, no 7, p. 5094-5100. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

&list_uids=11741894 >.

Rodriguez-Enriquez, S., L. He et J. J. Lemasters. 2004. «Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy». *Int J Biochem Cell Biol.* vol. 36, no 12, p. 2463-2472. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15325585 >.

Rohrmann, S., D. Zoller, S. Hermann et J. Linseisen. 2007. «Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort». *Br J Nutr.* vol. 98, no 6, p. 1112-1115. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18309547 >.

Rojas, F. J., et I. Moretti-Rojas. 2000. «Involvement of the calcium-specific protease, calpain, in the fertilizing capacity of human spermatozoa». *Int J Androl.* vol. 23, no 3, p. 163-168. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10844542 >.

Romanucci, M., A. Marinelli, G. Sarli et L. Della Salda. 2006. «Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours». *BMC Cancer.* vol. 6, p. 171. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16803633 >.

Ron, D., et J. F. Habener. 1992. «CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription». *Genes Dev.* vol. 6, no 3, p. 439-453. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1547942 >.

Rong, Y., et P. Mack. 2000. «Apoptosis induced by hyperthermia in Dunn osteosarcoma cell line in vitro». *Int J Hyperthermia.* vol. 16, no 1, p. 19-27. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669314 >.

Rossa, C., Jr., M. Liu et K. L. Kirkwood. 2008. «A dominant function of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression and osteoclastogenesis induction by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide». *J Periodontal Res.* vol. 43, no 2, p. 201-211. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18302623 >.

Rossi, C. R., S. Mocellin, P. Pilati, M. Foletto, L. Quintieri, P. Palatini et M. Lise. 2003. «Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin». *Surg Oncol Clin N Am.* vol. 12, no 3, p. 781-794. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14567031>.

Roti Roti, J. L. 2007. «Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication». *Int J Hyperthermia*. vol. 23, no 1, p. 3-15. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17575719>.

----- 2008. «Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events». *Int J Hyperthermia*. vol. 24, no 1, p. 3-15. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18214765>.

Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt et A. R. Nebreda. 1994. «A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins». *Cell*. vol. 78, no 6, p. 1027-1037. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7923353>.

Rovere-Querini, P., S. Brunelli, E. Clementi et A. A. Manfredi. 2008. «Cell death: tipping the balance of autoimmunity and tissue repair». *Curr Pharm Des*. vol. 14, no 3, p. 269-277. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18220837>.

Roxanne, Khamsi. 2007. «People who have had more than five oral-sex partners in their lifetime are 250% more likely to have throat cancer». *New England Journal of Medicine*. vol. 356, p. 1944.

Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1997. «The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases». *Embo J*. vol. 16, no 23, p. 6914-6925. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384571>.

Rubin, Philip. 2008(Berlin; New York, 2008). Springer.

Ruchalski, K., H. Mao, S. K. Singh, Y. Wang, D. D. Mosser, F. Li, J. H. Schwartz et S. C. Borkan. 2003. «HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells». *Am J Physiol Cell Physiol*. vol. 285, no 6, p. C1483-1493. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12930708>.

Rudner, J., A. Lepple-Wienhues, W. Budach, J. Berschauer, B. Friedrich, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff et C. Belka. 2001. «Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit

DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis». *J Cell Sci.* vol. 114, no Pt 23, p. 4161-4172. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739649>.

Rudolf, E., K. Rudolf et M. Cervinka. 2007. «Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells». *Cell Biol Toxicol.* En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17610029>.

Rutkowski, M. R., L. A. McNamee et A. G. Harmsen. 2007. «Neutrophils and inducible nitric-oxide synthase are critical for early resistance to the establishment of *Trichomonas foetus* infection». *J Parasitol.* vol. 93, no 3, p. 562-574. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17626348>.

Ruvolo, P. P. 2001. «Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways». *Leukemia.* vol. 15, no 8, p. 1153-1160. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11480555>.

-----, 2003. «Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites». *Pharmacol Res.* vol. 47, no 5, p. 383-392. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676512>.

Ryan-Harshman, M., et W. Aldoori. 2007. «Diet and colorectal cancer: Review of the evidence». *Can Fam Physician.* vol. 53, no 11, p. 1913-1920. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000268>.

Saido, T. C., H. Suzuki, H. Yamazaki, K. Tanoue et K. Suzuki. 1993. «In situ capture of mu-calpain activation in platelets». *J Biol Chem.* vol. 268, no 10, p. 7422-7426. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8463275>.

Sakabe, K., H. Teramoto, M. Zohar, B. Behbahani, H. Miyazaki, H. Chikumi et J. S. Gutkind. 2002. «Potent transforming activity of the small GTP-binding protein Rit in NIH 3T3 cells: evidence for a role of a p38gamma-dependent signaling pathway». *FEBS Lett.* vol. 511, no 1-3, p. 15-20. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11821041>.

Sakatani, M., S. Kobayashi et M. Takahashi. 2004. «Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos». *Mol Reprod Dev.* vol. 67, no 1, p. 77-82. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14648877>.

Salah-Eldin, A. E., S. Inoue, S. Tsukamoto, H. Aoi et M. Tsuda. 2003. «An association of Bcl-2 phosphorylation and Bax localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment». *Int J Cancer*. vol. 103, no 1, p. 53-60. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12455053>.

Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins et E. S. Alnemri. 2000. «Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70». *Nat Cell Biol*. vol. 2, no 8, p. 476-483. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10934467>.

Salinas, M., R. Lopez-Valdaliso, D. Martin, A. Alvarez et A. Cuadrado. 2000. «Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells». *Mol Cell Neurosci*. vol. 15, no 2, p. 156-169. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10673324>.

Salinthoné, S., M. Ba, L. Hanson, J. L. Martin, A. J. Halayko et W. T. Gerthoffer. 2007. «Overexpression of human Hsp27 inhibits serum-induced proliferation in airway smooth muscle myocytes and confers resistance to hydrogen peroxide cytotoxicity». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. vol. 293, no 5, p. L1194-1207. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17720870>.

Salomoni, P., et A. F. Khelifi. 2006. «Daxx: death or survival protein?». *Trends Cell Biol*. vol. 16, no 2, p. 97-104. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16406523>.

Samali, A., J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones et S. Orrenius. 1999. «Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells». *Embo J*. vol. 18, no 8, p. 2040-2048. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10205158>.

Samali, A., et T. G. Cotter. 1996. «Heat shock proteins increase resistance to apoptosis». *Exp Cell Res*. vol. 223, no 1, p. 163-170. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8635489>.

Sanchez, E. R., T. Redmond, L. C. Scherrer, E. H. Bresnick, M. J. Welsh et W. B. Pratt. 1988. «Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing

complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells». *Mol Endocrinol.* vol. 2, no 8, p. 756-760. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3062385>.

Sarker, K. P., K. K. Biswas, M. Yamakuchi, K. Y. Lee, T. Hahiguchi, M. Kracht, I. Kitajima et I. Maruyama. 2003. «ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death». *J Neurochem.* vol. 85, no 1, p. 50-61. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12641726>.

Sato, N., F. Urano, J. Yoon Leem, S. H. Kim, M. Li, D. Donoviel, A. Bernstein, A. S. Lee, D. Ron, M. L. Veselits, S. S. Sisodia et G. Thinakaran. 2000. «Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independent of presenilin expression». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 12, p. 863-870. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11146649>.

Sato, S., N. Fujita et T. Tsuruo. 2000. «Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 97, no 20, p. 10832-10837. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10995457>.

Sauna, Z. E., et S. V. Ambudkar. 2007. «About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work». *Mol Cancer Ther.* vol. 6, no 1, p. 13-23. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17237262>.

Saunders, M. I., et S. Dische. 1997. «Fractionation in radiotherapy: a view from the clinic». *The British journal of radiology.* vol. 70, no SPI, p. S17.

Sawai, H., T. Okazaki, H. Yamamoto, H. Okano, Y. Takeda, M. Tashima, H. Sawada, M. Okuma, H. Ishikura, H. Umehara et al. 1995. «Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells». *J Biol Chem.* vol. 270, no 45, p. 27326-27331. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7592995>.

Schindler, J. F., J. B. Monahan et W. G. Smith. 2007. «p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets». *J Dent Res.* vol. 86, no 9, p. 800-811. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17720847>.

Schlesinger, M. J. 1994. «How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins». *Pediatr Res.* vol. 36, no 1 Pt 1, p. 1-6. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7936827>.

Schmitt, E., M. Gehrmann, M. Brunet, G. Multhoff et C. Garrido. 2007. «Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy». *J Leukoc Biol.* vol. 81, no 1, p. 15-27. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16931602>.

Schroder, M. 2006. «The unfolded protein response». *Mol Biotechnol.* vol. 34, no 2, p. 279-290. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17172673>.

Schuler, M., et D. R. Green. 2001. «Mechanisms of p53-dependent apoptosis». *Biochem Soc Trans.* vol. 29, no Pt 6, p. 684-688. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11709054>.

Schultz, J., C. P. Ponting, K. Hofmann et P. Bork. 1997. «SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation». *Protein Sci.* vol. 6, no 1, p. 249-253. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9007998>.

Scorrano, L. 2003. «Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis». *Cell Death Differ.* vol. 10, no 12, p. 1287-1289. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12934065>.

Scorrano, L., et S. J. Korsmeyer. 2003. «Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 304, no 3, p. 437-444. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12729577>.

Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan et S. J. Korsmeyer. 2003. «BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis». *Science.* vol. 300, no 5616, p. 135-139. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12624178>.

Scriven, P., N. J. Brown, A. G. Pockley et L. Wyld. 2007. «The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding?». *J Mol Med.* vol. 85, no 4, p. 331-341. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17216204>.

Searle, Charles E. 1976. *Chemical carcinogens*. Washington: American Chemical Society.

Searles Nielsen, S., B. A. Mueller, S. Preston-Martin, E. A. Holly, J. Little, P. M. Bracci, M. McCredie, R. Peris-Bonet, S. Cordier, G. Filippini et F. Lubin. 2008. «Family cancer history and risk of brain tumors in children: results of the SEARCH international brain tumor study». *Cancer Causes Control*. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18278560>.

Sedlak, T. W., Z. N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L. H. Boise, C. B. Thompson et S. J. Korsmeyer. 1995. «Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 92, no 17, p. 7834-7838. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7644501>.

Seger, R., D. Seger, F. J. Lozeman, N. G. Ahn, L. M. Graves, J. S. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A. M. Jensen et E. G. Krebs. 1992. «Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases». *J Biol Chem*. vol. 267, no 36, p. 25628-25631. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1281467>.

Sekine, Y., K. Takeda et H. Ichijo. 2006. «The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases». *Curr Mol Med*. vol. 6, no 1, p. 87-97. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16472116>.

Shapiro, P. S., E. Vaisberg, A. J. Hunt, N. S. Tolwinski, A. M. Whalen, J. R. McIntosh et N. G. Ahn. 1998. «Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen». *J Cell Biol*. vol. 142, no 6, p. 1533-1545. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9744882>.

Shapiro, P. S., A. M. Whalen, N. S. Tolwinski, J. Wilsbacher, S. J. Froelich-Ammon, M. Garcia, N. Osheroff et N. G. Ahn. 1999. «Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation». *Mol Cell Biol*. vol. 19, no 5, p. 3551-3560. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10207078>.

Shen, Y. H., J. Godlewski, J. Zhu, P. Sathyanarayana, V. Leaner, M. J. Birrer, A. Rana et G. Tzivion. 2003. «Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors». *J Biol Chem*. vol. 278, no 29, p. 26715-26721. En ligne.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=12738796 >.

Sherbet, G. V., et M. S. Lakshmi. 1997. *The genetics of cancer : genes associated with cancer invasion, metastasis, and cell proliferation*. San Diego: Academic Press.

-----, 2008. *The genetics of cancer genes associated with cancer invasion, metastasis and cell proliferation*. San Diego [etc.]: Academic Press.

Sherman, M., et G. Multhoff. 2007. «Heat shock proteins in cancer». *Ann N Y Acad Sci*. vol. 1113, p. 192-201. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17978282 >.

Shibata, N., et M. Kobayashi. 2008. «[The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases]». *Brain Nerve*. vol. 60, no 2, p. 157-170. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18306664 >.

Shimizu, Y., et L. M. Hendershot. 2007. «Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum». *Adv Exp Med Biol*. vol. 594, p. 37-46. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17205673 >.

Shiozaki, K., et P. Russell. 1995. «Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast». *Nature*. vol. 378, no 6558, p. 739-743. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7501024 >.

Shiraha, H., A. Glading, J. Chou, Z. Jia et A. Wells. 2002. «Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain». *Mol Cell Biol*. vol. 22, no 8, p. 2716-2727. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11909964 >.

Shroff, E. H., C. Snyder et N. S. Chandel. 2007. «BCL-2 Family Members Regulate Anoxia-Induced Cell Death». *Antioxid Redox Signal*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17627475 >.

Sies, H. 1993. «Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection». *Mutat Res*. vol. 299, no 3-4, p. 183-191. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7683086 >.

Simon, H. U., A. Haj-Yehia et F. Levi-Schaffer. 2000. «Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction». *Apoptosis*. vol. 5, no 5, p. 415-418. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11256882>.

Singer, M. A., et S. Lindquist. 1998. «Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose». *Trends Biotechnol.* vol. 16, no 11, p. 460-468. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9830154>.

Singh, M., H. Sharma et N. Singh. 2007. «Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway». *Mitochondrion.* vol. 7, no 6, p. 367-373. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17855174>.

Skibba, J. L., F. E. Jones et R. E. Condon. 1982. «Altered hepatic disposition of doxorubicin in the perfused rat liver at hyperthermic temperatures». *Cancer Treat Rep.* vol. 66, no 6, p. 1357-1363. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7083240>.

Skutek, M., M. van Griensven, J. Zeichen, N. Brauer et U. Bosch. 2003. «Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis». *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* vol. 11, no 2, p. 122-129. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12664206>.

Smaili, S. S., Y. T. Hsu, A. C. Carvalho, T. R. Rosenstock, J. C. Sharpe et R. J. Youle. 2003. «Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling». *Braz J Med Biol Res.* vol. 36, no 2, p. 183-190. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12563519>.

Smaili, S. S., Y. T. Hsu, R. J. Youle et J. T. Russell. 2000. «Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis». *J Bioenerg Biomembr.* vol. 32, no 1, p. 35-46. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11768760>.

Sneed, P. K., P. R. Stauffer, M. W. McDermott, C. J. Diederich, K. R. Lamborn, M. D. Prados, S. Chang, K. A. Weaver, L. Spry, M. K. Malec, S. A. Lamb, B. Voss, R. L. Davis, W. M. Wara, D. A. Larson, T. L. Phillips et P. H. Gutin. 1998. «Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost +/- hyperthermia for glioblastoma multiforme». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 40, no 2, p. 287-295. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9457811>.

Solary, E., B. Eymin, N. Droin et M. Haugg. 1998. «Proteases, proteolysis, and apoptosis». *Cell Biol Toxicol.* vol. 14, no 2, p. 121-132. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9553723>.

Somasundaram, K., et W. S. El-Deiry. 1997. «Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region». *Oncogene*. vol. 14, no 9, p. 1047-1057. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9070653>.

Song, C. W. 1982. «Physiological factors in hyperthermia». *Natl Cancer Inst Monogr*. vol. 61, p. 169-176. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7177175>.

Song, J. J., et Y. J. Lee. 2004. «Daxx deletion mutant (amino acids 501-625)-induced apoptosis occurs through the JNK/p38-Bax-dependent mitochondrial pathway». *J Cell Biochem*. vol. 92, no 6, p. 1257-1270. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15258908>.

Sot, B., S. M. Freund et A. R. Fersht. 2007. «Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL». *J Biol Chem*. vol. 282, no 40, p. 29193-29200. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17699158>.

Soti, C., et P. Csermely. 2006. «Pharmacological modulation of the heat shock response». *Handb Exp Pharmacol*, no 172, p. 417-436. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16610369>.

Souslova, T., et D. A. Averill-Bates. 2004. «Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. vol. 60, no 5, p. 1538-1551. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15590186>.

Sperandio, S., K. Poksay, I. de Belle, M. J. Lafuente, B. Liu, J. Nasir et D. E. Bredesen. 2004. «Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix». *Cell Death Differ*. vol. 11, no 10, p. 1066-1075. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15195070>.

Sreedhar, A. S., et P. Csermely. 2004. «Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review». *Pharmacol Ther*. vol. 101, no 3, p. 227-257. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15031001>.

Srikanth, M., F. E. Davies et G. J. Morgan. 2008. «An update on drug combinations for treatment of myeloma». *Expert Opin Investig Drugs*. vol. 17, no 1, p. 1-12. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18095914>.

Srivastava, Rakesh, et Inc NetLibrary. «Apoptosis, cell signaling, and human diseases. Volume 2, Molecular mechanisms». Humana Press.

Stankiewicz, A. R., G. Lachapelle, C. P. Foo, S. M. Radicioni et D. D. Mosser. 2005. «Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation». *J Biol Chem*. vol. 280, no 46, p. 38729-38739. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16172114>.

Stankiewicz, A. R., A. M. Livingstone, N. Mohseni et D. D. Mosser. 2009. «Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70». *Cell Death Differ*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19148187>.

Steben, M., et E. Duarte-Franco. 2007. «Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology». *Gynecol Oncol*. vol. 107, no 2 Suppl, p. S2-5. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17938014>.

Steel, R., J. P. Doherty, K. Buzzard, N. Clemons, C. J. Hawkins et R. L. Anderson. 2004. «Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1». *J Biol Chem*. vol. 279, no 49, p. 51490-51499. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15371421>.

Stennicke, H. R., et G. S. Salvesen. 1997. «Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8». *J Biol Chem*. vol. 272, no 41, p. 25719-25723. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9325297>.

Stevenson, M. A., S. K. Calderwood et G. M. Hahn. 1986. «Rapid increases in inositol trisphosphate and intracellular Ca⁺⁺ after heat shock». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 137, no 2, p. 826-833. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3488059>.

-----, 1987. «Effect of hyperthermia (45 degrees C) on calcium flux in Chinese hamster

ovary HA-1 fibroblasts and its potential role in cytotoxicity and heat resistance». *Cancer Res.* vol. 47, no 14, p. 3712-3717. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3109731>.

Stewart, B. W. 1994. «Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators». *J Natl Cancer Inst.* vol. 86, no 17, p. 1286-1296. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8064887>.

Stewart, J. R., et C. A. O'Brian. 2004. «Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition». *Invest New Drugs.* vol. 22, no 2, p. 107-117. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14739659>.

Stokoe, D., D. G. Campbell, S. Nakielnny, H. Hidaka, S. J. Leever, C. Marshall et P. Cohen. 1992. «MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase». *Embo J.* vol. 11, no 11, p. 3985-3994. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1327754>.

Strasser, A., et K. Newton. 1999. «FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth». *Int J Biochem Cell Biol.* vol. 31, no 5, p. 533-537. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10399313>.

Strobl, S., C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki et W. Bode. 2000. «The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 97, no 2, p. 588-592. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10639123>.

Sturzbecher, H. W., P. Chumakov, W. J. Welch et J. R. Jenkins. 1987. «Mutant p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock-related proteins in SV40-transformed monkey cells».

Oncogene. vol. 1, no 2, p. 201-211. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2830579>.

Subject, J. R., J. J. Sciandra et R. J. Johnson. 1982. «Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics». *Br J Radiol.* vol. 55, no 656, p. 579-584. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7116088>.

Sun, W., K. Kesavan, B. C. Schaefer, T. P. Garrington, M. Ware, N. L. Johnson, E. W. Gelfand et G. L. Johnson. 2001. «MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway». *J Biol Chem.* vol. 276, no 7, p. 5093-5100. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11073940>.

Sundaram, M. V. 2006. «RTK/Ras/MAPK signaling». *WormBook*, p. 1-19. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18050474>.

Suzuki, K., S. Tsuji et S. Ishiura. 1981. «Effect of Ca²⁺ on the inhibition of calcium-activated neutral protease by leupeptin, antipain and epoxysuccinate derivatives». *FEBS Lett.* vol. 136, no 1, p. 119-122. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6274695>.

Suzuki, T., J. Lu, M. Zahed, K. Kita et N. Suzuki. 2007. «Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells». *Arch Biochem Biophys.* vol. 468, no 1, p. 1-14. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17936241>.

Swanson, Benjamin J., et Microbiology University of Nebraska Medical Center. Dept. of Pathology and. 2007. «The Role of MUC1 and its ligand myelin-associated glycoprotein in pancreatic cancer perineural invasion».

Sweeney, G., R. Somwar, T. Ramlal, A. Volchuk, A. Ueyama et A. Klip. 1999. «An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes». *J Biol Chem.* vol. 274, no 15, p. 10071-10078. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10187787>.

Szasz, A. 2007. «Hyperthermia, a modality in the wings». *J Cancer Res Ther.* vol. 3, no 1, p. 56-66. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17998724>.

Szatrowski, T. P., et C. F. Nathan. 1991. «Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells». *Cancer Res.* vol. 51, no 3, p. 794-798. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1846317>.

Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman et A. Samali. 2006. «Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis». *EMBO Rep.* vol. 7, no 9, p. 880-885. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16953201>.

Szenczi, O., P. Kemecei, Z. Miklos, L. Ligeti, L. H. Snoeckx, N. A. van Riel, J. Op den Buijs, G. J. Van der Vusse et T. Ivanics. 2005. «In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart». *Pflugers Arch.* vol. 449, no 6, p. 518-525. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15490226>.

Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen et J. C. Reed. 1998. «A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases». *J Biol Chem.* vol. 273, no 14, p. 7787-7790. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9525868>.

Takahashi, T., H. Shimizu, K. Inoue, H. Morimatsu, K. Umeda, E. Omori, R. Akagi et K. Morita. 2007. «[Protective role of HO-1 in oxidative tissue injuries]». *Nippon Yakurigaku Zasshi.* vol. 130, no 4, p. 252-256. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17938507>.

Takeishi, T., T. R. Martin, I. M. Katona, F. D. Finkelman et S. J. Galli. 1991. «Differences in the expression of the cardiopulmonary alterations associated with anti-immunoglobulin E-induced or active anaphylaxis in mast cell-deficient and normal mice. Mast cells are not required for the cardiopulmonary changes associated with certain fatal anaphylactic responses». *J Clin Invest.* vol. 88, no 2, p. 598-608. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1864969>.

Takekawa, M., F. Posas et H. Saito. 1997. «A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways». *Embo J.* vol. 16, no 16, p. 4973-4982. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305639>.

Takenaka, K., T. Moriguchi et E. Nishida. 1998. «Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest». *Science.* vol. 280, no 5363, p. 599-602. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9554853>.

Tamiya-Koizumi, K., H. Umekawa, S. Yoshida, H. Ishihara et K. Kojima. 1989. «A novel phospholipase A2 associated with nuclear matrix: stimulation of the activity and modulation of the Ca²⁺ dependency by polyphosphoinositides». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1002, no 2, p. 182-188. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2539188>.

Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariaty, P. Cohen et M. J. Comb. 1996. «FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2». *Embo J.* vol. 15, no 17, p. 4629-4642. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8887554>.

Tanabe, K., S. Akamatsu, H. Suga, S. Takai, K. Kato, S. Dohi et O. Kozawa. 2005. «Midazolam suppresses thrombin-induced heat shock protein 27 phosphorylation through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocytes». *J Cell Biochem.* vol. 96, no 1, p. 56-64. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16052527>.

Tanguay, R. M., Y. Wu et E. W. Khandjian. 1993. «Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress». *Dev Genet.* vol. 14, no 2, p. 112-118. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8482015>.

Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi et E. Nishida. 2000. «A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators». *Nat Cell Biol.* vol. 2, no 2, p. 110-116. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655591>.

Tashjian, J. A., M. W. Dewhirst, D. Needham et B. L. Viglianti. 2008. «Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques». *Int J Hyperthermia.* vol. 24, no 1, p. 79-90. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18214771>.

Téallier, Pierre Jérôme Sébastien. 1836. *Du cancer de la matrice, de ses causes, de son diagnostic et de son traitement*. Paris: BailliÃre.

Temkin, V., et M. Karin. 2007. «From death receptor to reactive oxygen species and c-Jun N-terminal protein kinase: the receptor-interacting protein 1 odyssey». *Immunol Rev.* vol. 220, p. 8-21. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17979836>.

Temme, A., J. A. Rodriguez, S. Hendruschk, S. Gunes, B. Weigle, K. Schakel, M. Schmitz, M. Bachmann, G. Schackert et E. P. Rieber. 2007. «Nuclear localization of Survivin renders HeLa tumor cells more sensitive to apoptosis by induction of p53 and Bax». *Cancer Lett.* vol.

250, no 2, p. 177-193. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17084966>.

Terasawa, K., K. Okazaki et E. Nishida. 2003. «Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway». *Genes Cells*. vol. 8, no 3, p. 263-273. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12622723>.

Thevissen, K., I. E. Francois, J. Winderickx, C. Pannecouque et B. P. Cammue. 2006.

«Ceramide involvement in apoptosis and apoptotic diseases». *Mini Rev Med Chem*. vol. 6, no 6, p. 699-709. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16787381>.

Thiebaut, A. C., V. Kipnis, A. Schatzkin et L. S. Freedman. 2008. «The role of dietary measurement error in investigating the hypothesized link between dietary fat intake and breast cancer--a story with twists and turns». *Cancer Invest*. vol. 26, no 1, p. 68-73. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18181048>.

Thomas, A., T. Giesler et E. White. 2000. «p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway». *Oncogene*. vol. 19, no 46, p. 5259-5269. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11077443>.

Thomas, Gordon. 2001. *Cancer doctory : the biography of Josef Issels, M.D. : who brought hope to the world with his revolutionary cancer treatment*. Tempe, Ariz.: Dandelion Books.

Thomas, G., J. Haavik et P. Cohen. 1997. «Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells». *Eur J Biochem*. vol. 247, no 3, p. 1180-1189. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9288946>.

Thomison, J., 3rd, L. K. Thomas et K. R. Shroyer. 2008. «Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma». *Hum Pathol*. vol. 39, no 2, p. 154-166. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18206494>.

Thornberry, N. A. 1998. «Caspases: key mediators of apoptosis». *Chem Biol*. vol. 5, no 5, p. R97-103. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9578633>.

Thornberry, N. A., et Y. Lazebnik. 1998. «Caspases: enemies within». *Science*. vol. 281, no 5381, p. 1312-1316. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9721091>.

Thygesen, L. C., K. Wu, M. Gronbaek, C. S. Fuchs, W. C. Willett et E. Giovannucci. 2008. «Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Comparison of Approaches for Including Repeated Measures of Alcohol Consumption». *Epidemiology*. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18300715>.

Tibbles, L. A., Y. L. Ing, F. Kiefer, J. Chan, N. Iscove, J. R. Woodgett et N. J. Lassam. 1996. «MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6». *Embo J*. vol. 15, no 24, p. 7026-7035. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9003778>.

Tissieres, A., H. K. Mitchell et U. M. Tracy. 1974. «Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs». *J Mol Biol*. vol. 85, no 3, p. 389-398. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4209479>.

Tokalov, S. V., et H. O. Gutzzeit. 2003. «The heat shock-induced cell cycle arrest is attenuated by weak electromagnetic fields». *Cell Prolif*. vol. 36, no 2, p. 101-111. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12680877>.

Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki et P. Friedrich. 2001. «Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 280, no 5, p. 1333-1339. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11162675>.

Tongers, J., B. Fiedler, D. Konig, T. Kempf, G. Klein, J. Heineke, T. Kraft, S. Gambaryan, S. M. Lohmann, H. Drexler et K. C. Wollert. 2004. «Heme oxygenase-1 inhibition of MAP kinases, calcineurin/NFAT signaling, and hypertrophy in cardiac myocytes». *Cardiovasc Res*. vol. 63, no 3, p. 545-552. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15276480>.

Torii, S., D. A. Egan, R. A. Evans et J. C. Reed. 1999. «Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs)». *Embo J*. vol. 18, no 21, p. 6037-6049. En ligne.
 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=10545115 >.

Toth, A., P. Nickson, A. Mandl, M. L. Bannister, K. Toth et P. Erhardt. 2007. «Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases». *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. vol. 7, no 3, p. 205-218. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17896961>.

Tournier, C., C. Dong, T. K. Turner, S. N. Jones, R. A. Flavell et R. J. Davis. 2001. «MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines». *Genes Dev*. vol. 15, no 11, p. 1419-1426. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11390361>.

Tousey, Sinclair. 1921. *Medical electricity and Röntgen rays and radium : with a practical chapter on phototherapy*. Philadelphia: Saunders.

Tran, S. E., A. Meinander, T. H. Holmstrom, A. Rivero-Muller, K. M. Heiskanen, E. K. Linnau, M. J. Courtney, D. D. Mosser, L. Sistonen et J. E. Eriksson. 2003. «Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis». *Cell Death Differ*. vol. 10, no 10, p. 1137-1147. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14502237>.

Tronov, V. A., E. M. Konstantinov et Kramarenko, II. 2002. «[Hyperthermia induced signal for apoptosis and pathways of its transduction in the cell]». *Tsitologiya*. vol. 44, no 11, p. 1079-1088. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12561728>.

Truta, B., Y. Y. Chen, A. M. Blanco, G. Deng, P. G. Conrad, Y. H. Kim, E. T. Park, S. Kakar, Y. S. Kim, F. Velayos, M. H. Sleisenger et J. P. Terdiman. 2008. «Tumor histology helps to identify Lynch syndrome among colorectal cancer patients». *Fam Cancer*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18283560>.

Tsuruta, F., J. Sunayama, Y. Mori, S. Hattori, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, K. Yoshioka, N. Masuyama et Y. Gotoh. 2004. «JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins». *Embo J*. vol. 23, no 8, p. 1889-1899. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15071501>.

Tu, S., G. P. McStay, L. M. Boucher, T. Mak, H. M. Beere et D. R. Green. 2006. «In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis». *Nat Cell Biol*. vol. 8, no 1, p. 72-77. En ligne.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>

&list_uids=16362053 >.

Tukagoshi, S. 2003. «[Cancer chemotherapy; past, present and future--from the aspect of fundamental studies]». *Gan To Kagaku Ryoho*. vol. 30, no 10, p. 1398-1403. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14584271 >.

Turcotte, S., et D. A. Averill-Bates. 2001. «Sensitization to the cytotoxicity of melphalan by ethacrynic acid and hyperthermia in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells». *Radiat Res*. vol. 156, no 3, p. 272-282. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11500136 >.

UICC. 2007. «UICC eNEWS July 2007». *UICC e-news*. En ligne.
<file:///C:/Documents%20and%20Settings/Labo_a/Local%20Settings/Temporary%20Internet%20Files/Content.IE5/3AAWIFAJ/enews_0707%5B1%5D.pdf>.

Um, H. D., J. M. Orenstein et S. M. Wahl. 1996. «Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway». *J Immunol*. vol. 156, no 9, p. 3469-3477. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617975 >.

Umegaki, Y. 1987. «[History of radiotherapy]». *Gan no rinsho. Japan journal of cancer clinics*. vol. Spec No, p. 1-8.

Urade, R. 2007. «Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants». *Febs J*. vol. 274, no 5, p. 1152-1171. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17257164 >.

Urano, F., A. Bertolotti et D. Ron. 2000. «IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum». *J Cell Sci*. vol. 113 Pt 21, p. 3697-3702. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034898 >.

Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding et D. Ron. 2000. «Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1». *Science*. vol. 287, no 5453, p. 664-666. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10650002 >.

van der Zee, J. 2002. «Heating the patient: a promising approach?». *Ann Oncol*. vol. 13, no 8, p. 1173-1184. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12181239 >.

Van der Zee, J., et M. C. Erasmus. 2007. «Hyperthermia in addition to radiotherapy». *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. vol. 19, no 3 Suppl, p. S18. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17359773 >.

VanSlyke, J. K., et L. S. Musil. 2002. «Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress». *J Cell Biol*. vol. 157, no 3, p. 381-394. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11980915 >.

Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannikulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai et D. Wallach. 1998. «Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally». *Immunity*. vol. 9, no 2, p. 267-276. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9729047 >.

Vaudry, D., P. J. Stork, P. Lazarovici et L. E. Eiden. 2002. «Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections». *Science*. vol. 296, no 5573, p. 1648-1649. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12040181 >.

Vaughn, D. J. 2007. «Chemotherapy for good-risk germ cell tumors: current concepts and controversies». *Urol Clin North Am*. vol. 34, no 2, p. 171-177; abstract viii-ix. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17484922 >.

Vayalil, P. K., K. E. Iles, J. Choi, A. K. Yi, E. M. Postlethwait et R. M. Liu. 2007. «Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. vol. 293, no 5, p. L1281-1292. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17890327 >.

Vayssier, M., et B. S. Polla. 1998. «Heat shock proteins chaperoning life and death». *Cell Stress Chaperones*. vol. 3, no 4, p. 221-227. En ligne.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9880234 >.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson et D. L. Vaux. 2000. «Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins». *Cell*. vol. 102, no 1, p. 43-53. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929712>.

Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks et R. N. Kolesnick. 1996.

«Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis».

Nature. vol. 380, no 6569, p. 75-79. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8598911>.

Verkhatsky, A. 2007. «Calcium and cell death». *Subcell Biochem*. vol. 45, p. 465-480. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18193648>.

Vermeulen, K., Z. N. Berneman et D. R. Van Bockstaele. 2003. «Cell cycle and apoptosis».

Cell Prolif. vol. 36, no 3, p. 165-175. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12814432>.

Vertrees, R. A., G. C. Das, A. M. Coscio, J. Xie, J. B. Zwischenberger et P. J. Boor. 2005.

«A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells». *Mol Carcinog*. vol. 44, no 2, p. 111-121. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16114053>.

Villalba, M., J. Bockaert et L. Journot. 1997. «Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway». *J Neurosci*. vol. 17, no 1, p. 83-90. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8987738>.

Volloch, V., D. D. Mosser, B. Massie et M. Y. Sherman. 1998. «Reduced thermotolerance in aged cells results from a loss of an hsp72-mediated control of JNK signaling pathway». *Cell Stress Chaperones*. vol. 3, no 4, p. 265-271. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9880239>.

Waddell, William. 2004. «DOSE-RESPONSE CURVES IN CHEMICAL

CARCINOGENESIS». *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*. vol. 2, no 1, p. 11-20.

Wadhwa, R., T. Sugihara, A. Yoshida, H. Nomura, R. R. Reddel, R. Simpson, H. Maruta et S. C. Kaul. 2000. «Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function». *Cancer Res*. vol. 60, no 24,

p. 6818-6821. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11156371>.

Walker, N. I., B. V. Harmon, G. C. Gobe et J. F. Kerr. 1988. «Patterns of cell death».

Methods Achiev Exp Pathol. vol. 13, p. 18-54. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3045494>.

Wang, B., Y. Yang et P. A. Friedman. 2008. «NHERF1, a Novel AKT-associating Protein, Regulates ERK Signaling through a B-Raf Mediated Pathway». *Mol Biol Cell.* En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18272783>.

Wang, C., et J. Chen. 2003. «Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53». *J Biol Chem.* vol. 278, no 3, p. 2066-2071. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12427754>.

Wang, C. C., Y. M. Chiang, S. C. Sung, Y. L. Hsu, J. K. Chang et P. L. Kuo. 2008.

«Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells». *Cancer Lett.* vol. 259, no 1, p. 82-98. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18023967>.

Wang, L., N. Azad, L. Kongkaneramt, F. Chen, Y. Lu, B. H. Jiang et Y. Rojanasakul. 2008.

«The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation». *J Immunol.* vol. 180, no 5, p. 3072-3080. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18292530>.

Wang, T. H., H. S. Wang et Y. K. Soong. 2000. «Regulation and functions of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase». *Chang Gung Med J.* vol. 23, no 2, p. 57-72.

En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10835800>.

Wang, W., et W. S. El-Deiry. 2008. «Restoration of p53 to limit tumor growth». *Curr Opin Oncol.* vol. 20, no 1, p. 90-96. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18043262>.

Wang, W., C. Z. Prince, Y. Mou et M. J. Pollman. 2002. «Notch3 signaling in vascular

smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas

ligand-induced apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 277, no 24, p. 21723-21729. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11925448>.

Wang, X., C. H. McGowan, M. Zhao, L. He, J. S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang et J. Han. 2000. «Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest». *Mol Cell Biol.* vol. 20, no 13, p. 4543-4552. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10848581>.

Wang, X. Z., B. Lawson, J. W. Brewer, H. Zinszner, A. Sanjay, L. J. Mi, R. Boorstein, G. Kreibich, L. M. Hendershot et D. Ron. 1996. «Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)». *Mol Cell Biol.* vol. 16, no 8, p. 4273-4280. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8754828>.

Wang, Y. 2007. «Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases». *Circulation.* vol. 116, no 12, p. 1413-1423. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17875982>.

Warshawsky, David, et Joseph R. Landolph. 2005. *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer*. Boca Raton: CRC, Taylor and Francis.

Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud et J. A. Cooper. 1997. «Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2». *Embo J.* vol. 16, no 8, p. 1909-1920. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9155017>.

Watabayashi, T., N. Nakahara et J. Yoshida. 2005. «[Hyperthermia for therapy of brain tumors by means of magnetite cationic liposomes]». *Nippon Rinsho.* vol. 63 Suppl 9, p. 490-494. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16201569>.

Webster, K. A., R. M. Graham, J. W. Thompson, M. G. Spiga, D. P. Frazier, A. Wilson et N. H. Bishopric. 2006. «Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction». *Antioxid Redox Signal.* vol. 8, no 9-10, p. 1667-1676. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16987020>.

Wei, M. C., T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson et S. J. Korsmeyer. 2000. «tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c». *Genes Dev.* vol. 14, no 16, p. 2060-2071. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10950869>.

Weinberg, Robert A. 1998. *One renegade cell : how cancer begins*. New York, NY: Basic Books.

-----, 2007. *The biology of cancer*. New York: Garland Science.

Weston, C. R., et R. J. Davis. 2007. «The JNK signal transduction pathway». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 19, no 2, p. 142-149. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17303404>.

Westwick, J. K., A. E. Bielawska, G. Dbaiibo, Y. A. Hannun et D. A. Brenner. 1995.
«Ceramide activates the stress-activated protein kinases». *J Biol Chem.* vol. 270, no 39, p. 22689-22692. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7559390>.

Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda et R. J. Davis. 1998. «A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation». *Science.* vol. 281, no 5383, p. 1671-1674. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9733513>.

Whitmarsh, A. J., S. H. Yang, M. S. Su, A. D. Sharrocks et R. J. Davis. 1997. «Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors». *Mol Cell Biol.* vol. 17, no 5, p. 2360-2371. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9111305>.

Wieder, T., C. E. Orfanos et C. C. Geilen. 1998. «Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine». *J Biol Chem.* vol. 273, no 18, p. 11025-11031. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9556584>.

Wike-Hooley, J. L., J. Van der Zee, G. C. van Rhoon, A. P. Van den Berg et H. S. Reinhold. 1984. «Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy». *Eur J Cancer Clin Oncol.* vol. 20, no 5, p. 619-623. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6539698>.

Williams, N. E., et E. M. Nelsen. 1997. «HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of Tetrahymena». *J Cell Sci.* vol. 110 (Pt 14), p. 1665-1672. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9247200>.

Wong, W. W., et H. Puthalakath. 2008. «Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway». *IUBMB Life*. vol. 60, no 6, p. 390-397. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18425793>.

Wrzal, P. K., A. Bettaieb et D. A. Averill-Bates. 2008. «Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells». *Radiat Res*. vol. 170, no 4, p. 498-511. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19024657>.

Wu, H. Y., K. Tomizawa et H. Matsui. 2007. «Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder». *Acta Med Okayama*. vol. 61, no 3, p. 123-137. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17593948>.

Wu, R., H. Kausar, P. Johnson, D. E. Montoya-Durango, M. Merchant et M. J. Rane. 2007. «Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex». *J Biol Chem*. vol. 282, no 30, p. 21598-21608. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17510053>.

Wu, S. J., et L. T. Ng. 2007. «MAPK inhibitors and pifithrin-alpha block cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells». *Food Chem Toxicol*. vol. 45, no 12, p. 2446-2453. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17673346>.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis et M. E. Greenberg. 1995. «Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis». *Science*. vol. 270, no 5240, p. 1326-1331. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7481820>.

Xu, J., L. J. Lian, C. Wu, X. F. Wang, W. Y. Fu et L. H. Xu. 2007. «Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice». *Food Chem Toxicol*. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18226849>.

Xu, J., C. H. Yeh, S. Chen, L. He, S. L. Sensi, L. M. Canzoniero, D. W. Choi et C. Y. Hsu. 1998. «Involvement of de novo ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor-

alpha/cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death». *J Biol Chem.* vol. 273, no 26, p. 16521-16526. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9632721 >.

Yaglom, J. A., V. L. Gabai, A. B. Meriin, D. D. Mosser et M. Y. Sherman. 1999. «The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage». *J Biol Chem.* vol. 274, no 29, p. 20223-20228. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10400639 >.

Yaglom, J. A., V. L. Gabai et M. Y. Sherman. 2007. «High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways». *Cancer Res.* vol. 67, no 5, p. 2373-2381. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17332370 >.

Yamamoto, K., H. Ichijo et S. J. Korsmeyer. 1999. «BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M». *Mol Cell Biol.* vol. 19, no 12, p. 8469-8478. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10567572 >.

Yamasaki, S., N. Yagishita, K. Nishioka et T. Nakajima. 2007. «The roles of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway». *Cell Cycle.* vol. 6, no 11, p. 1319-1323. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17582219 >.

Yan, C., M. Takahashi, M. Okuda, J. D. Lee et B. C. Berk. 1999. «Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium». *J Biol Chem.* vol. 274, no 1, p. 143-150. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9867822 >.

Yanase, M., M. Shinkai, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida et T. Kobayashi. 1998. «Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes». *Jpn J Cancer Res.* vol. 89, no 7, p. 775-782. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9738985 >.

Yang, A. L., A. G. Smith, R. Akhtar, B. Clothier, S. Robinson, M. MacFarlane et M. F. Festing. 1999. «Low levels of p53 are associated with resistance to tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in DBA/2 mice». *Pharmacogenetics.* vol. 9, no 2, p. 183-188. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10376765>.

Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang et D. Baltimore. 1997. «Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis». *Cell*. vol. 89, no 7, p. 1067-1076. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9215629>.

Yasuda, J., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma et R. J. Davis. 1999. «The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins». *Mol Cell Biol*. vol. 19, no 10, p. 7245-7254. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490659>.

Ye, C. P., S. Yano, J. Tfelt-Hansen, R. J. MacLeod, X. Ren, E. Terwilliger, E. M. Brown et N. Chattopadhyay. 2004. «Regulation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by calcium-sensing receptor involves p38 MAP kinase». *J Neurosci Res*. vol. 75, no 4, p. 491-498. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14743432>.

Yin, H. L., Y. Suzuki, Y. Matsumoto, M. Tomita, Y. Furusawa, A. Enomoto, A. Morita, M. Aoki, F. Yatagai, T. Suzuki, Y. Hosoi, K. Ohtomo et N. Suzuki. 2004. «Radiosensitization by hyperthermia in the chicken B-lymphocyte cell line DT40 and its derivatives lacking nonhomologous end joining and/or homologous recombination pathways of DNA double-strand break repair». *Radiat Res*. vol. 162, no 4, p. 433-441. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15447039>.

Youle, R. J., et M. Karbowski. 2005. «Mitochondrial fission in apoptosis». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 6, no 8, p. 657-663. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16025099>.

Youle, R. J., et A. Strasser. 2008. «The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 9, no 1, p. 47-59. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18097445>.

Young, A., et D. J. Kerr. 2000. «Genetic and immunological therapy for cancer». *Journal of the Royal Society of Medicine*. vol. 93, no 1, p. 10-14.

Yu, C., Y. Minemoto, J. Zhang, J. Liu, F. Tang, T. N. Bui, J. Xiang et A. Lin. 2004. «JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD». *Mol Cell*. vol. 13, no 3, p. 329-340. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14967141>.

Yu, J., et L. Zhang. 2005. «The transcriptional targets of p53 in apoptosis control». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 331, no 3, p. 851-858. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15865941>.

Yuan, H. J., et W. M. Lee. 2008. «Nonresponse to treatment for hepatitis C: current management strategies». *Drugs.* vol. 68, no 1, p. 27-42. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18081371>.

Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis et H. R. Horvitz. 1993. «The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme». *Cell.* vol. 75, no 4, p. 641-652. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8242740>.

Yuan, Z. Q., R. I. Feldman, M. Sun, N. E. Olashaw, D. Coppola, G. E. Sussman, S. A. Shelley, S. V. Nicosia et J. Q. Cheng. 2002. «Inhibition of JNK by cellular stress- and tumor necrosis factor alpha-induced AKT2 through activation of the NF kappa B pathway in human epithelial Cells». *J Biol Chem.* vol. 277, no 33, p. 29973-29982. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12048203>.

Zabucchi, G., P. Bellavite, G. Berton et P. Dri. 1980. «Free radicals generation by the inflammatory cells». *Agents Actions Suppl.* vol. 7, p. 159-166. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6264767>.

Zamzami, N., C. Maise, D. Metivier et G. Kroemer. 2001. «Measurement of membrane permeability and permeability transition of mitochondria». *Methods Cell Biol.* vol. 65, p. 147-158. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11381591>.

Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, T. Hirsch, S. A. Susin, P. X. Petit, B. Mignotte et G. Kroemer. 1995. «Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death». *J Exp Med.* vol. 182, no 2, p. 367-377. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7629499>.

Zelnak, A. B. 2007. «Clinical pharmacology and use of microtubule-targeting agents in cancer therapy». *Methods Mol Med.* vol. 137, p. 209-234. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18085232>.

Zha, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman et S. J. Korsmeyer. 1997. «BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity». *J Biol Chem.* vol. 272, no 39, p. 24101-24104. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305851>.

Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel et S. J. Korsmeyer. 1996. «Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)». *Cell.* vol. 87, no 4, p. 619-628. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8929531>.

Zhang, J. P., W. Y. Liang, Z. H. Luo, Z. C. Yang, H. C. Chan et Y. S. Huang. 2007. «Involvement of p38 MAP kinase in burn-induced degradation of membrane phospholipids and upregulation of cPLA2 in cardiac myocytes». *Shock.* vol. 28, no 1, p. 86-93. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17483741>.

Zhang, K., et R. J. Kaufman. 2006. «Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response». *Handb Exp Pharmacol*, no 172, p. 69-91. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16610355>.

-----, 2006. «The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease». *Neurology.* vol. 66, no 2 Suppl 1, p. S102-109. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16432136>.

Zhang, R., D. Luo, R. Miao, L. Bai, Q. Ge, W. C. Sessa et W. Min. 2005. «Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis». *Oncogene.* vol. 24, no 24, p. 3954-3963. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15782121>.

Zhang, S., J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus, R. J. Ulevitch et G. M. Bokoch. 1995. «Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1». *J Biol Chem.* vol. 270, no 41, p. 23934-23936. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7592586>.

Zhang, X., M. Wang, C. Zhou, S. Chen et J. Wang. 2005. «The expression of iASPP in acute leukemias». *Leuk Res.* vol. 29, no 2, p. 179-183. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15607367>.

Zhang, X. Y., J. S. Zhang, W. Kong et L. L. Jia. 2005. «[Oxidative stress induced HSP27 expression in human lens epithelial cells is regulated by P38 map kinase.]». *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. vol. 41, no 1, p. 47-51. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15774115>.

Zhao, C., et E. Wang. 2004. «Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts». *Cell Signal*. vol. 16, no 3, p. 313-321. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14687661>.

Zhao, D. L., L. B. Zou, S. Lin, J. G. Shi et H. B. Zhu. 2007. «Anti-apoptotic effect of esculin on dopamine-induced cytotoxicity in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line». *Neuropharmacology*. vol. 53, no 6, p. 724-732. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17904593>.

Zhou, G., Z. Q. Bao et J. E. Dixon. 1995. «Components of a new human protein kinase signal transduction pathway». *J Biol Chem*. vol. 270, no 21, p. 12665-12669. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7759517>.

Zhou, R., N. A. Gray, P. Yuan, X. Li, J. Chen, G. Chen, P. Damschroder-Williams, J. Du, L. Zhang et H. K. Manji. 2005. «The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers». *J Neurosci*. vol. 25, no 18, p. 4493-4502. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15872096>.

Zhu, L., X. Yu, Y. Akatsuka, J. A. Cooper et C. Anasetti. 1999. «Role of mitogen-activated protein kinases in activation-induced apoptosis of T cells». *Immunology*. vol. 97, no 1, p. 26-35. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10447711>.

Zhuang, S., et R. G. Schnellmann. 2006. «A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase». *J Pharmacol Exp Ther*. vol. 319, no 3, p. 991-997. En ligne.
 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16801453>.

Ziegler, David, et Andrew Kung. 2008. «Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer». *Current opinion in oncology*. vol. 20, no 1, p. 97.

Zlender, V. 2006. «[Detection of apoptosis]». *Arh Hig Rada Toksikol*. vol. 57, no 2, p. 229-236. En ligne.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16832979>.

Zornig, M., A. Hueber, W. Baum et G. Evan. 2001. «Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1551, no 2, p. F1-37. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11591448>.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg et X. Wang. 1997. «Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3». *Cell*. vol. 90, no 3, p. 405-413. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9267021>.

Zundel, W., et A. Giaccia. 1998. «Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress». *Genes Dev*. vol. 12, no 13, p. 1941-1946. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9649498>.

Zundel, W., L. M. Swiersz et A. Giaccia. 2000. «Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide». *Mol Cell Biol*. vol. 20, no 5, p. 1507-1514. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669728>.

Zylicz, M., F. W. King et A. Wawrzynow. 2001. «Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein». *Embo J*. vol. 20, no 17, p. 4634-4638. En ligne.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11532927>.

ANNEXE

**BETTAIEB A, AVERILL-BATES DA. THERMOTOLERANCE INDUCED AT
A MILD TEMPERATURE OF 40 DEGREES C PROTECTS CELLS
AGAINST HEAT SHOCK-INDUCED APOPTOSIS.**

J CELL PHYSIOL. 2005; 205(1):47-57.

Thermotolerance Induced At A Mild Temperature of 40°C Protects Cells Against Heat Shock-Induced Apoptosis

AHMED BETTAIEB AND DIANA A. AVERILL-BATES*

Département de chimie-biochimie and TOXEN, Université du Québec à Montréal,
Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, Canada

Apoptosis constitutes a response of organisms to various physiological or pathological stimuli, and to different stresses. The ability of thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C to protect against activation of the apoptotic cascade by heat shock was investigated. When Chinese hamster ovary and human adenocarcinoma cervical cells were pretreated at 40°C for 3 h, they were resistant to subsequent lethal heat shock at 43°C. Induction of thermotolerance at 40°C led to increased expression of heat shock proteins 27, 32, 72, and 90. Heat shock induced apoptotic events at the mitochondrial level, involving a decrease in membrane potential, translocation of Bax to mitochondria, and liberation of cytochrome c into the cytosol. These events were diminished in thermotolerant cells. Heat shock (42–45°C) caused activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3, -6, and -7, relative to controls at 37°C. Activation of caspases was decreased in thermotolerant cells. Heat shock caused fragmentation of the caspase substrate, inhibitor of caspase-activated DNase. Fragmentation was diminished in thermotolerant cells. Thermotolerance afforded protection against heat shock-induced nuclear chromatin condensation, but not against necrosis. *J. Cell. Physiol.* 205: 47–57, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Long term objectives in cancer research are to be able to control or eliminate all cancers. To achieve these goals, new treatment strategies have continued to appear during the past decades, in addition to surgery, radiation, and chemotherapy. Hyperthermia is among the innovative methods of cancer treatment, mainly as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy (Hahn and Li, 1982). Many in vitro and in vivo studies have shown the benefits of hyperthermia (Liu and Wilson, 1998). Regional hyperthermia has the potential to increase cytotoxic effects of radiation or chemotherapeutic agents within the tumor volume, without increasing normal tissue toxicity. Hyperthermia kills tumor cells by heating them to a few degrees above physiological temperatures (Van der Zee, 2002; Wust et al., 2002). Hyperthermia itself kills cells starting at 41.8°C. In the clinic, this technique is applied in combination with cytotoxic agents by localized heating of the tumor region at higher temperatures such as 42–43°C for 1–2 h or by milder heating at 39.5–41°C for longer times (6–24 h). The latter, whole body hyperthermia, is often used to treat carcinomas with distant metastases. To date, at least 18 randomized studies have demonstrated that the combination of hyperthermia with either radiotherapy, chemotherapy, or both, led to improved clinical outcome (Van der Zee, 2002). This was demonstrated for cancers of the head and neck, breast, brain, rectum, cervix, oesophagus, lung, vulva/vagina and for melanoma.

Exposure to elevated temperatures leads to development of heat resistance, known as thermotolerance (Subjeck et al., 1982). Thermotolerance is related to the capacity of cells to survive or to recover from exposures to lethal heat shock. It can also protect cells and tissues against damage caused by other forms of stress such as oxidative stress (Gill et al., 1998; Martindale and Holbrook, 2002) and environmental stressors. Two types of thermotolerance exist. Thermotolerance can be developed at lethal temperatures (43–45°C), although cells must be returned to physiological temperature (37°C) for several hours. During this time, protein synthesis is inhibited. When protein synthesis recommences, cells are

resistant to subsequent lethal heat shock. Thermotolerance can also develop during continuous heating (e.g., 24 h) at non-lethal temperatures (39.5–41.5°C) (Field and Anderson, 1982; Przybytkowski et al., 1986). At mild temperatures such as 40°C, protein synthesis is not inhibited, but continues throughout the heating period (Przybytkowski et al., 1986). Thermotolerance is transient and generally declines within several days.

Mammalian cells respond to environmental stress by activating heat shock transcription factors (e.g., Hsf1), that regulate increased synthesis of HSPs. Thermotolerance is at least partially associated with the induction of heat shock proteins (HSPs), especially HSP72 (Landry et al., 1982; Li and Werb, 1982; Mizzen and Welch, 1988). Acquisition of thermotolerance required Hsf1-mediated gene expression, since Hsf1 (–/–) cells could not develop thermotolerance and were not able to resist heat-induced apoptosis (McMillan et al., 1998; Luft et al., 2001). However, evidence that HSPs are responsible for thermotolerance is correlative rather than causal. Furthermore, several studies reported that thermotolerance can develop in the absence of cellular HSP induction (Kregel, 2002).

Formerly Dr. Diana Bates.

Contract grant sponsor: Natural Science and Engineering Research Council of Canada; Contract grant sponsor: Cancer Research Society, Inc.; Contract grant sponsor: University Mission of Tunisia in North America.

*Correspondence to: Diana A. Averill-Bates, Département de chimie-biochimie and TOXEN, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada. E-mail: averill.diana@uqam.ca

Received 18 August 2004; Accepted 7 January 2005

DOI: 10.1002/jcp.20386

Some HSPs are constitutively expressed, whereas others are induced by stress. Stress-induced HSPs can protect cells against damage by preventing protein denaturation and by repairing denatured proteins in order to restore their biological functions (Parsell and Lindquist, 1993). HSPs also confer resistance to various kinds of stress such as oxidative stress and heat shock (Huot et al., 1991; Martindale and Holbrook, 2002). They also play a complex role in apoptosis. Certain HSPs such as HSP27, HSP72, and HSP90 can inhibit apoptosis, whereas HSP60 can promote apoptosis (Sreedhar and Csermely, 2004). The protective effect of HSPs against various types of stress and their mode of action is complex and not entirely understood.

The ability of thermotolerance induced at mild temperatures to protect against apoptosis has received little attention. Mild temperatures are physiological and occur during fevers. They are also achieved during hyperthermia treatment in the clinic. This study investigates the protective effect of thermotolerance developed at 40°C against apoptosis induced by lethal temperatures (42–45°C) in Chinese hamster ovary (CHO) cells and in human cervical carcinoma (HeLa) cells. We also determine whether certain HSPs are induced during mild heating at 40°C. Apoptotic events were evaluated at the level of mitochondria, caspases and cleavage of caspase substrates.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HeLa (ATCC no. CCL-2) and CHO (Ling and Thompson, 1974) cells were grown in monolayer in Eagle's modified Dulbecco medium and minimum essential medium- α , respectively, plus 10% fetal bovine serum (Gibco Canada, Burlington, ON) containing 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50 μ g/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON) (Lord-Fontaine and Averill-Bates, 2002). Cells were maintained in 50 ml of medium in 75 cm² tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC, Canada) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were grown to confluence (stationary phase of the cell cycle), at which point the culture medium was changed. To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to an identical incubator for 3 or 6 h at 40 \pm 0.1°C, following a period of 20 min to allow the temperature of the culture medium to reach 40°C (Przybytkowski et al., 1986). Cells that were maintained at 37°C and 40°C were harvested using phosphate-buffered saline (PBS)-citrate (0.015M sodium citrate) (CHO) and 0.5 mg/ml trypsin; 0.2 mg/ml EDTA in PBS (HeLa) and washed by centrifugation (1000g, 3 min). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3 or 6 h, evaluated by trypan blue exclusion (data not shown).

Cytotoxicity

Cytotoxicity was evaluated using sulforhodamine B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) to stain cellular protein (Kast and Gros, 1998). Freshly harvested thermotolerant or non-thermotolerant cells (5×10^3 /ml) were heated at 43°C in temperature-controlled water baths (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, Canada), with a temperature precision of $\pm 0.02^\circ\text{C}$. Under these conditions, 1 ml of cell suspension reached a temperature within 0.1°C of the water bath temperature within 3 min. The time for heat shock treatment was calculated after the 3 min heating period. After the appropriate time (0–120 min), cells were diluted and then incubated in a 96-well microplate at 37°C. After 3 days, medium was replaced with trichloroacetic acid (17% in PBS) for 1 h at 4°C. Subsequently, cells were stained using sulforhodamine B (0.4%) in 1% acetic acid at 22°C. After 10 min, excess color was removed and stained cells were dissolved in 200 μ l of 10 mM Tris (pH 9). Absorbance at 540 nm represented the density of cells that survived the heat treatment. The proportion of surviving cells was expressed as a percentage of cells in the untreated control.

Western blot analysis of HSPs and inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD)

For HSPs, cells were harvested after the appropriate time (0–6 h) at 37°C or 40°C. For ICAD, thermotolerant and non-thermotolerant cells were harvested and heated (37–45°C) for 2 h in temperature-controlled water baths ($\pm 0.02^\circ\text{C}$). Cells were then centrifuged and lysed in 500 μ l of lysis buffer (Samali et al., 1999) containing 100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 5% freshly added percoll, 0.01% digitonin, 1 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF), and 100 μ l/10 ml of cocktail of protease inhibitors pH 7.4. Thereafter, debris, unbroken cells, and nuclei were removed by centrifugation (10,000g, 10 min). Protein concentrations were determined according to Bradford (1976). 30 μ g of protein were solubilized in sample buffer (Laemmli, 1970), separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8%–12%) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using a Millipore Graphite Electrophoretic Transfer apparatus (Millipore, Bedford, MA) (Turcotte and Averill-Bates, 2001). Membranes were probed with the following primary antibodies: Hsp27 L2R3 (gift from Dr. Jacques Landry, Centre de recherche, Hotel-Dieu de Québec, QC, Canada), HSP27 (1:1000), HO-1/HO-2 (1:500), HSP70/Hsc70 (1:2000), HSP90 (1:1000) (Stressgen, Victoria, BC, Canada) and polyclonal rabbit anti-ICAD antibody (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Secondary antibodies used were goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal anti-mouse IgG (1:1000) for HSP27, HSP70/Hsc70, and HSP90 or HRP-conjugated rat MAb-anti-rabbit IgG (1:1000) (Biosource, Camarillo, CA). Membranes were incubated in ECL-Plus chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) and films (Fuji medical X-ray film, Düsseldorf, Germany) were scanned with a Laser Scanning Densitometer (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). HSP protein expression was quantified using IPGEL software, relative to actin or tubulin loading controls.

Membrane potential

Thermotolerant and non-thermotolerant CHO and HeLa cells were harvested and heated (37–45°C) for 1 h in temperature-controlled water baths ($\pm 0.02^\circ\text{C}$). Rhodamine 123 (0.8 μ M) (Molecular Probes, Eugene, OR) was added for 5 min at 22°C. Cells were washed three times by centrifugation (2,500g, 3 min) and resuspended in 1 ml of cold PBS. Mitochondrial membrane potential was determined by flow cytometry at 530 nm using a FacScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) (Darzynkiewicz et al., 1992). Cell viability was monitored using propidium iodide at 585 nm.

Subcellular fractionation and Western blot analysis of Bax and cytochrome c

After 30 or 60 min of heating (37–45°C) in temperature-controlled water baths ($\pm 0.02^\circ\text{C}$), thermotolerant and non-thermotolerant cells were centrifuged (2500g, 3 min) and resuspended in 500 μ l of lysis buffer (see HSPs). Membranes were broken using a dounce homogeniser (50 strokes/sample). Debris, unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation (10,000g, 10 min) and supernatants were then centrifuged (15,000g, 15 min) to separate mitochondria. Supernatants were centrifuged (100,000g, 1 h) to separate cytosolic and nucleosomal fractions (Jurkiewicz et al., 2004). Mitochondrial fractions were resuspended in lysis buffer (300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 0.1 mM DTT, 100 μ l/10 ml of cocktail of protease inhibitors, pH 7.4). Proteins (30 μ g) from mitochondrial and cytosolic fractions were separated by SDS-PAGE (12% for Bax; 15% for cytochrome c) and transferred to PVDF membranes. Membranes were probed with mouse anti-cytochrome c monoclonal antibody (1:1000) (BD Biosciences, Mississauga, ON) or rabbit polyclonal anti-Bax antibody (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and then with an appropriate HRP-conjugated second antibody (1:1000). Purity of cytoplasmic and mitochondrial fractions was verified using antibodies to GST π_1 (Calbiochem, La Jolla, CA) and cytochrome c oxidase, respectively (Molecular Probes).

Caspase activity

Freshly harvested cells were heated (37–45°C) for 1 h (caspase-9) or 2 h (caspase-3, -6, and -7) in temperature-controlled water baths ($\pm 0.02^\circ\text{C}$). Cells were then centrifuged using a microfuge (3000 rpm, 3 min) and resuspended in 50 μl of reaction buffer (20 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonic acid (CHAPS), 10% sucrose, pH 7.2) (Stennicke and Salvesen, 1997). Cells were lysed at -20°C for 10 min and then specific caspase substrates (200 μM) (Calbiochem) were added; Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methyl-coumarin for caspase-3, Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC for caspase-6, MCA-VDQVWGK(DNP)-NH₂ for caspase-7, and Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl-coumarin for caspase-9. The kinetic reaction for caspase activity was followed for 30 min at respective excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm for caspases-3 and -6, 325 and 390 nm for caspase-7, and 400 and 505 nm for caspase-9, using a spectrofluorimeter (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Chromatin condensation

Cells were heated (37–45°C) for 2 h in culture dishes. Where indicated, 10 μM (CHO cells) or 20 μM (HeLa) of a general caspase inhibitor (Z-VAD.fmk) (Calbiochem) were added for 1 h (CHO), or 2 h (HeLa cells), before heat treatment. Thereafter, Hoechst 33258 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (blue-green fluorescence) (Sigma Chemical Co.), which binds to condensed chromatin in the nucleus of apoptotic cells, was added for 15 min. Propidium iodide (Sigma Chemical Co.) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was subsequently added to visualize necrotic cells (red fluorescence) by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd., St. Laurent, QC, Canada). For each dish, at least 300 cells were counted. Apoptotic or necrotic indices were calculated relative to total cells (Hoorens et al., 2001).

Statistics

Data are presented as means \pm SEM from at least three independent experiments performed with multiple estimations per point. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups were made by one-way analysis of variance (ANOVA). For HSP levels and caspase activity, one-factor ANOVA with additional Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ($\alpha = 5\%$). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). For significant differences, $P < 0.05$.

RESULTS

Thermotolerance induced at 40°C protects cells against cytotoxicity of heat shock

CHO (Fig. 1A) and HeLa (Fig. 1B) cells were heated at a mild temperature of 40°C for 3 h, prior to lethal heat shock at 43°C for up to 120 min. These thermotolerant cells were more resistant to subsequent heat shock at 43°C than unheated control cells.

Induction of HSP expression at 40°C

Given that thermotolerance induced by lethal heat shock usually involves HSP induction, expression of several HSPs was evaluated after heating at the non-lethal temperature (40°C) in CHO (Fig. 2A) and HeLa (data not shown) cells. For both cell types, expression of HSPs 27, 32, 72, and 90 was significantly increased after 2 or 3 h at 40°C, compared to controls (Fig. 2B–I). Expression of HSPs remained elevated up to 6 h, except for HSP32 in HeLa cells, which declined by 6 h. Although the inducible form of HSP70 (HSP72) increased at 40°C (Fig. 2D,H), expression of the constitutive form (HSP73) did not change (data not shown). Expression of HSPs in control cells at 37°C did not change during 6 h (Fig. 2B–I).

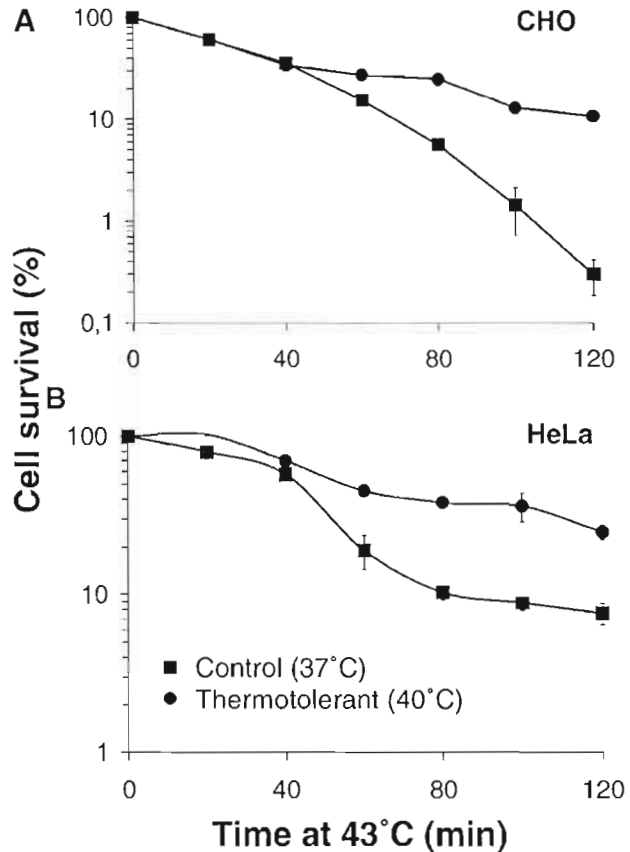


Fig. 1. Induction of thermotolerance at 40°C: resistance to cytotoxicity at 43°C. A: CHO and (B) HeLa cells were incubated for 3 h at 40°C to induce thermotolerance and then harvested and resuspended in PBS-1% BSA-10 mM glucose. Thermotolerant (●) and non-thermotolerant (■) cells were subsequently exposed to heat shock (43°C) for 0–120 min. Data represent means and SEM of at least three independent experiments. For analysis of curves for non-thermotolerant versus thermotolerant CHO and HeLa cells, $P < 0.0001$.

Thermotolerance induced at 40°C protects cells against a heat shock-induced decrease in membrane potential

Subsequently, the ability of thermotolerance induced at 40°C to protect cells against heat shock-induced apoptosis was investigated at the mitochondrial level. An early event in the mitochondrial pathway is depolarization of the mitochondrial membrane. Membrane potential (ψ_m) in CHO (Fig. 3A) and HeLa (Fig. 3B) cells decreased after a 1 h exposure to elevated temperatures. The decrease in ψ_m was more pronounced at 43°C and 45°C. As a positive control, the ionophore carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (Sigma Chemical Co.) caused a rapid decrease in ψ_m in controls, to 40% and 70% of initial levels in CHO and HeLa cells, respectively. It should be noted that 1 h at 42°C is non-cytotoxic to cells (data not shown), whereas a 1 h exposure to 43°C (Fig. 1) and 45°C is cytotoxic. Thermotolerance induced at 40°C inhibited the decrease in ψ_m at 43°C and 45°C in CHO cells (Fig. 3A). There appeared to be a small protective effect due to thermotolerance at 42°C and 43°C in HeLa cells (Fig. 3B). There was, in fact, a clear increase in ψ_m at 43°C and 45°C in thermotolerant CHO cells, indicating membrane hyperpolarization (Fig. 3A). There was a tendency towards a low level of hyperpolarization at

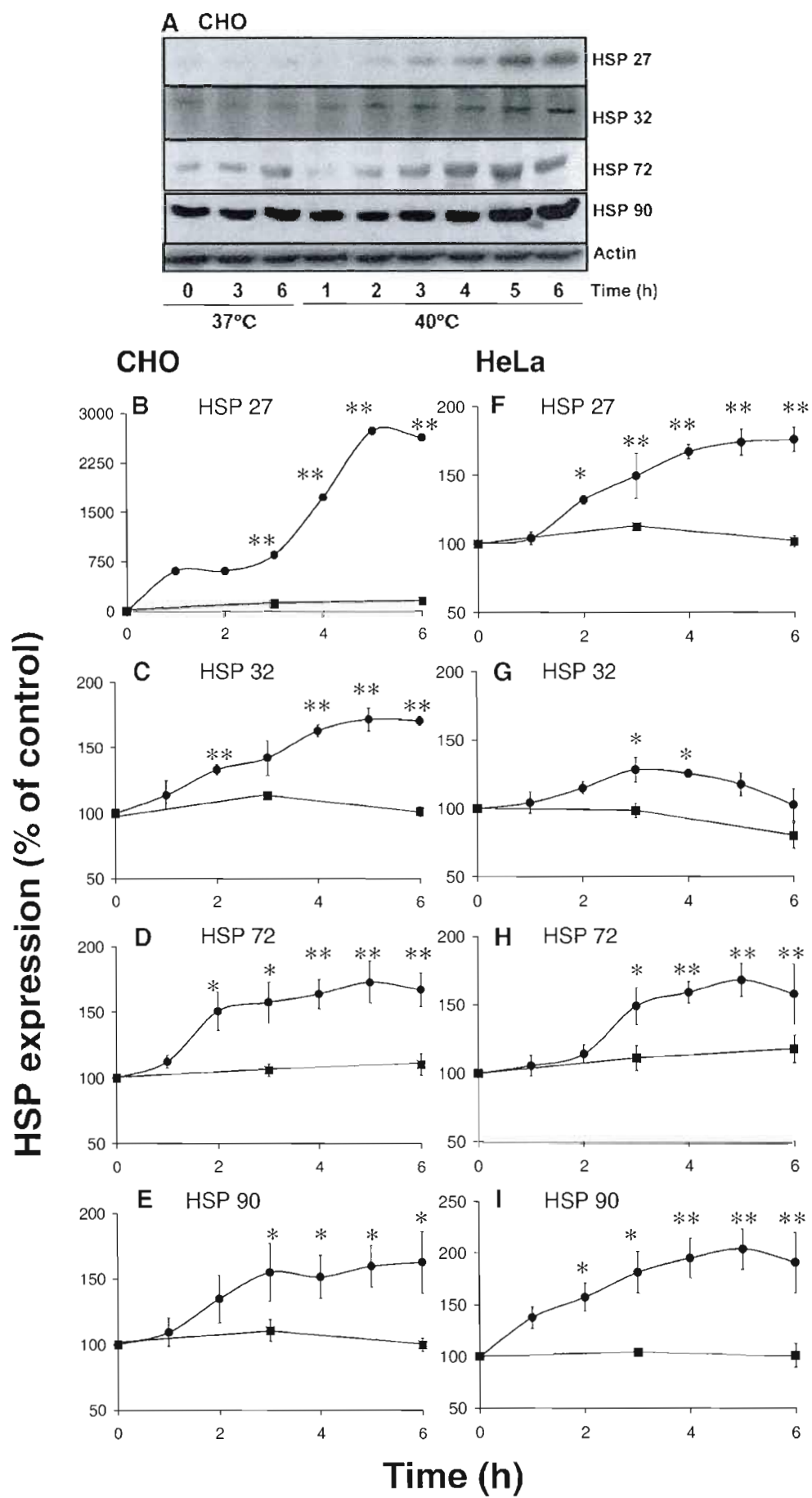


Fig. 2.

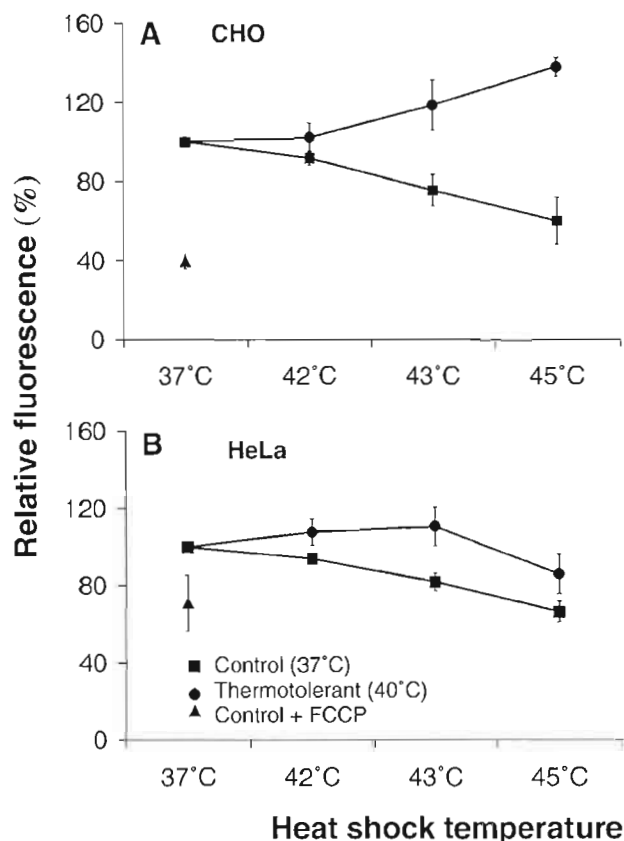


Fig. 3. Thermotolerance at 40°C protects cells against heat shock-induced membrane depolarization. Thermotolerant (3 h, 40°C) (●) and non-thermotolerant (3 h, 37°C) (■) CHO (A) or HeLa (B) cells were heated (37–45°C) for 1 h. FCCP (5 μ M) was added to control cells (▲). Rhodamine 123 (0.8 μ M) was added and fluorescence was expressed relative to non-thermotolerant control cells at 37°C (100%). Data are mean and SEM of at least four experiments.

42°C and 43°C in HeLa cells (Fig. 3B), which was less pronounced compared to CHO cells.

Thermotolerance induced at 40°C inhibits heat shock-induced translocation of Bax and cytochrome c

An important molecular event in apoptosis is translocation of pro-apoptotic proteins including Bax from the cytoplasm to mitochondria, thus interfering with anti-apoptotic functions of proteins like Bcl-2. As a consequence, release of pro-apoptotic proteins such as cytochrome c from mitochondria will be promoted. Heat shock induced translocation of Bax from the cytosol (Fig. 4A) to mitochondria (Fig. 4B) in CHO and HeLa (data not shown) cells. Bax expression decreased in cytoplasmic fractions with increasing temperature from 42°C to 45°C and the decrease was more pronounced after 60 min (Fig. 4D,E). Cytosolic levels of Bax did not change in control cells at 37°C during 60 min (Fig. 4A). Increased levels of Bax were detected in mitochondrial fractions after 1 h of exposure to thermal shock in CHO cells (Fig. 4B,F) and HeLa cells (data not shown).

However, thermotolerance induced at 40°C diminished Bax translocation from the cytosol to mitochondria in CHO (Fig. 4D,F) and HeLa (Fig. 4E) cells. Purity of cytoplasmic and mitochondrial fractions was 94% and >96%, respectively (Fig. 4C).

Levels of cytochrome c in mitochondrial fractions decreased as a function of time (30–60 min) and temperature (37–45°C) in HeLa (Fig. 5A) and CHO (data not shown) cells. In thermotolerant cells, levels of mitochondrial cytochrome c were higher than in control CHO (Fig. 5B) or HeLa (Fig. 5A,C) cells. This indicated that thermotolerance at 40°C decreased the liberation of cytochrome c from mitochondria in heat shocked cells. These findings were confirmed by corresponding changes in the cytosolic fraction (data not shown).

Thermotolerance attenuates activation of caspases by heat shock

Release of cytochrome c into the cytoplasm leads to auto-activation of initiator caspase-9 and subsequent proteolytic activation of executor caspases-3, -6, and -7. Heat shock (42–43°C) caused activation of caspase-9 in CHO (Fig. 6A) and HeLa (Fig. 6E) cells. Caspases-3, -6, and -7 were also activated at 42°C and 43°C in CHO (Fig. 6B–D) and HeLa (Fig. 6F–H) cells. Activation occurred at 45°C for some, but not all caspases. In thermotolerant cells, activation of caspases-9, -3, -6, and -7 decreased at 42°C and 43°C, relative to non-thermotolerant controls (Fig. 6A–H). At 45°C, there were either small or no differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells, except for caspase-7.

Protection against ICAD cleavage by thermotolerance at 40°C

The ability of thermotolerance at 40°C to prevent heat shock-induced cleavage of ICAD was investigated. ICAD cleavage leads to release of the active protease caspase-activated DNase (CAD), which causes DNA fragmentation. Levels of ICAD decreased, with increasing temperature from 37°C to 45°C, in HeLa (Fig. 7A) and CHO (data not shown) cells. Nevertheless, ICAD cleavage was diminished in thermotolerant HeLa (Fig. 7A,C) and CHO (Fig. 7B) cells.

Thermotolerance affords protection against heat shock-induced chromatin condensation

One of the later events in the apoptotic cascade is chromatin condensation in the nucleus. This event can be triggered by activation of CAD, resulting from ICAD cleavage by caspases (Nicholson, 1999). Heat shock (42–45°C) induced chromatin condensation in CHO (Fig. 8, parts 8A-2, 8A-3, 8A-4) and HeLa (data not shown) cells, relative to controls at 37°C (Fig. 8A-1). Thermotolerance at 40°C decreased the apoptotic index at 42°C and 43°C in CHO (Fig. 8, parts 8B-2, 8B-3, and 8D) and HeLa (Fig. 8F) cells. Heat-induced chromatin condensation was inhibited by a general caspase inhibitor, Z-VAD.fmk, in CHO (Fig. 8, parts 8C-2, 8C-3, 8C-4, 8D) and HeLa (Fig. 8F) cells, indicating that it was the consequence of caspase activation.

Propidium iodide was used to distinguish between cell death by apoptosis and necrosis. The necrotic index increased at 45°C in CHO (Fig. 8E) cells and at 43–45°C

Fig. 2. Induction of heat shock proteins by mild heat shock at 40°C. CHO (A) and HeLa (data not shown) cells were heated at 40°C for 1–6 h. HSP27 (B, F), HSP32 (C, G), HSP72 (D, H), and HSP90 (E, I) were detected using antibodies that recognize both hamster and human, except for anti-HSP27 which detects only hamster (B). Actin was the

loading control. Levels of HSPs in heated CHO (B–E) and HeLa (F–I) cells (●) were analysed by densitometry and expressed relative to control cells maintained at 37°C (■) (100%). Gels are representative of at least three independent experiments. B–I: For levels of HSPs at 40°C relative to controls at 37°C: $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**).

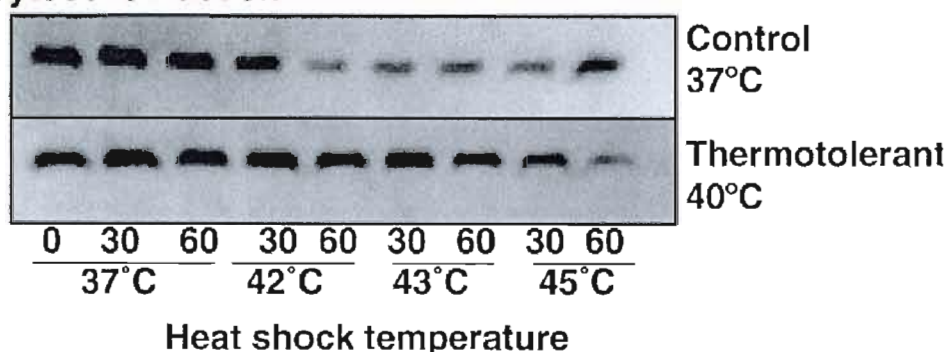
in HeLa cells (Fig. 8G). There was no protection against necrosis in thermotolerant cells (Fig. 8E,G).

DISCUSSION

This study demonstrates that hyperthermia (42–45°C) induces apoptosis by a cascade of events involving the mitochondrial pathway, caspase activation, and

cleavage of intracellular caspase substrates, in proliferating CHO and HeLa cells. Hyperthermia caused a decrease in mitochondrial membrane potential, recruitment of pro-apoptotic protein Bax to the mitochondrial membrane and liberation of pro-apoptotic factor cytochrome c into the cytosol. Cytochrome c release leads to activation of initiator caspase-9. Caspase-9 activation

A CHO, cytosolic fraction



B CHO, mitochondrial fraction

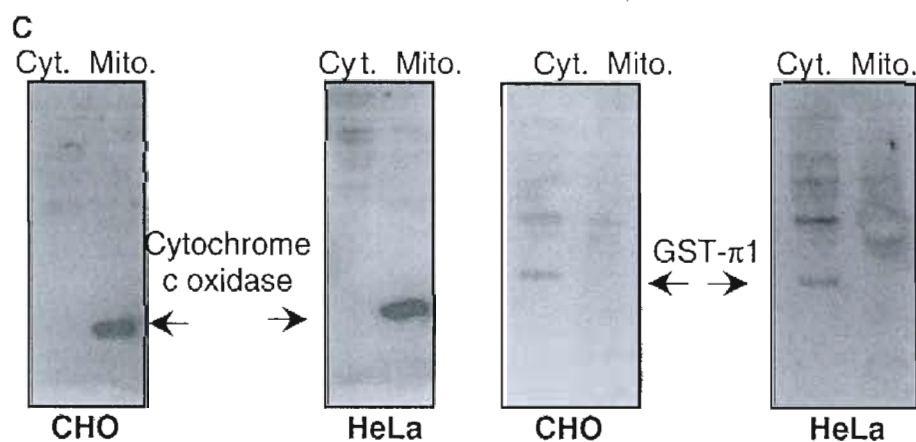
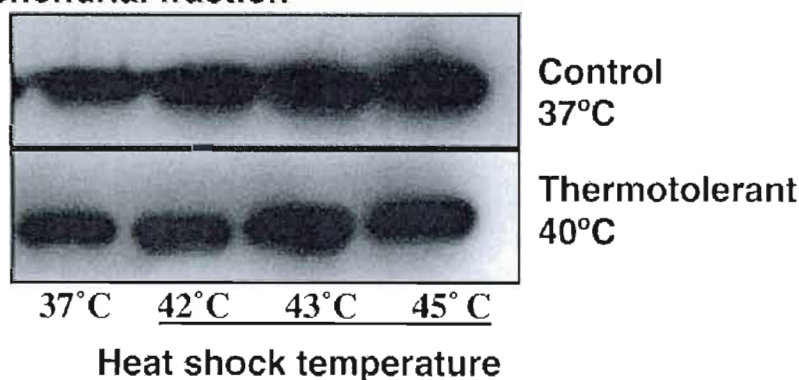


Fig. 4. Thermotolerance at 40°C inhibits heat shock-induced Bax translocation from the cytoplasm to mitochondria. Thermotolerant and non-thermotolerant CHO and HeLa cells were heated (37–45°C) for 30 or 60 min. Immunoblots are shown for Bax (21 kDa) levels in (A) cytosolic and (B) mitochondrial fractions of CHO cells. Similar blots were obtained for HeLa cells (data not shown). C: Purity of cytosolic and mitochondrial fractions in CHO and HeLa cells was confirmed using antibodies against GST π_1 and cytochrome c oxidase, respectively. Protein levels were quantified by densitometry in cytosolic fractions of (D) CHO and (E) HeLa cells and in mitochondrial fractions of (F) CHO cells, and expressed relative to non-thermotolerant control

cells at 37°C (100%). Thermotolerant cells are shown following 30 (●) or 60 min (○) of heat shock, relative to non-thermotolerant cells after 30 (■) or 60 (□) min. Means and SEM are shown for four independent experiments, with three estimations per point. D, E: For non-thermotolerant CHO and HeLa cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant decrease in cytosolic Bax expression in cells heated for 2 h at 42–45°C vs. 2 h at 37°C; $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). For analysis of curves for thermotolerant versus non-thermotolerant CHO cells after 60 min of heat shock, $P < 0.05$. For analysis of curves for thermotolerant vs. non-thermotolerant HeLa cells after 30 and 60 min of heat shock, $P < 0.001$.

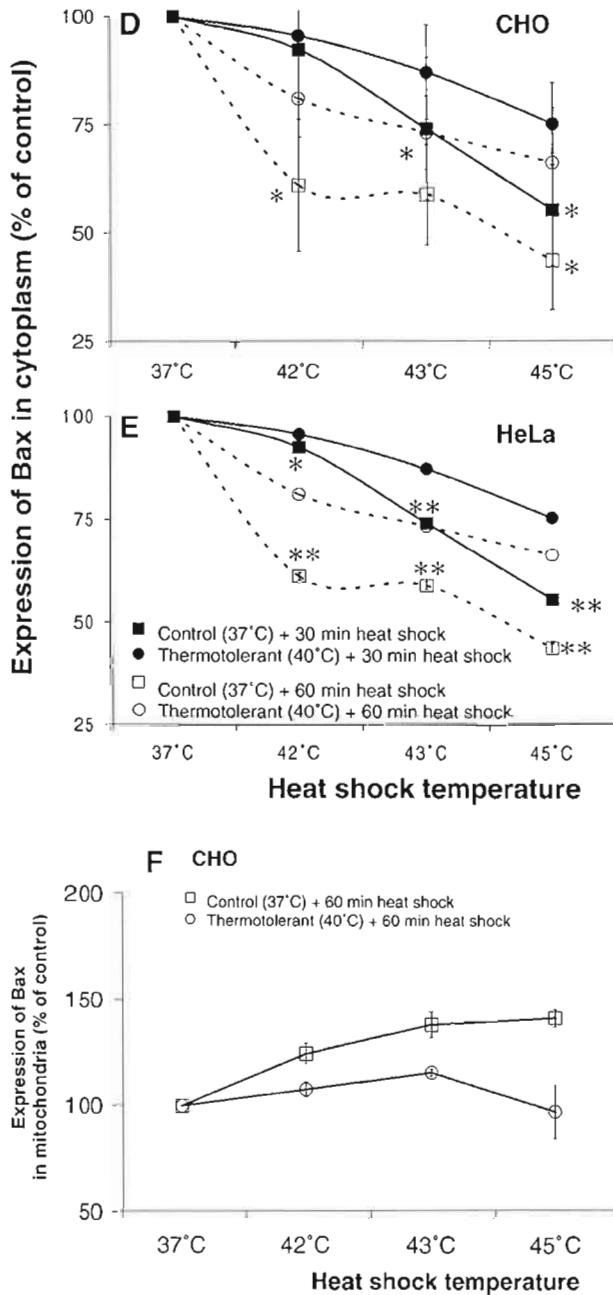


Fig. 4. (Continued)

occurs within the apoptosome, which is a complex composed of cytochrome c, apoptosis protease activating factor (apaf-1) and procaspase-9 (Strasser et al., 2000). Activation of caspase-9 in heated cells led to activation of executor caspases-3, -6, and -7. The caspase substrates ICAD and nuclear chromatin were fragmented in heat-shocked cells.

Several studies have reported induction of apoptosis by hyperthermia (42–44°C), mostly evidenced by DNA fragmentation, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and chromatin condensation in human T-lymphocytes (Mosser and Martin, 1992; Boreham et al., 1997), HL-60 leukemia cells (Poe and O'Neill, 1997), mouse embryo fibroblasts (Buzzard et al., 1998), and IMC-3 human maxillary carcinoma cells (Ohtsubo et al., 2001). In human leukemia cells (PLB-985), 42°C

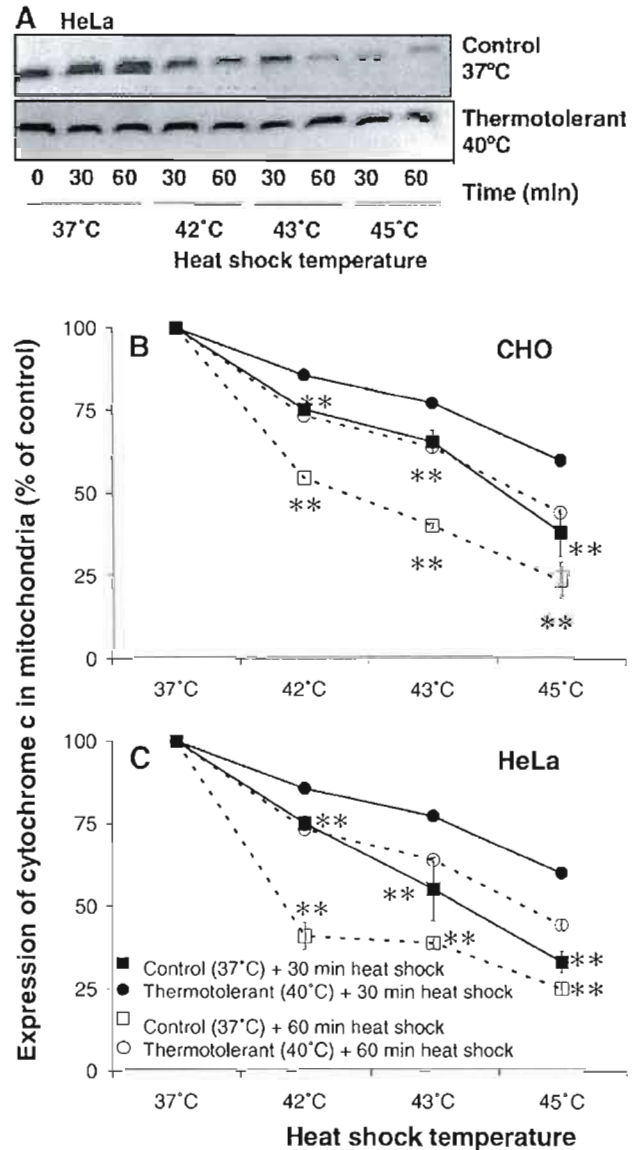


Fig. 5. Thermotolerance at 40°C inhibits heat shock-induced cytochrome c release from mitochondria into the cytoplasm: Thermotolerant and non-thermotolerant CHO and HeLa cells were heated (37–45°C) for 30 or 60 min. Proteins from the mitochondrial and cytosolic fractions were detected using a mouse monoclonal antibody that recognizes both human and hamster cytochrome c (12 kDa). Immunoblots are shown for cytochrome c levels in mitochondrial fractions of (A) HeLa cells. Similar blots were obtained for CHO cells (data not shown). Proteins levels were quantified by densitometry in (B) CHO and (C) HeLa cells and expressed relative to control cells at 37°C (100%). Thermotolerant cells are shown following 30 (●) or 60 (○) min of heat shock, relative to non-thermotolerant cells after 30 (■) or 60 (□) min. Data are mean and SEM of three independent experiments. B, C: For non-thermotolerant CHO and HeLa cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant decrease in mitochondrial cytochrome c expression in cells heated for 2 h at 42–45°C vs. 2 h at 37°C; $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). For analysis of curves for thermotolerant versus non-thermotolerant CHO and HeLa cells, $P < 0.001$.

hyperthermia did not alter expression of Bcl-2 and Bax proteins, but appeared to activate apoptosis via death receptors (Katschinski et al., 1999).

The induction of thermotolerance by fever temperatures (39.5–41.5°C) has received little attention. This study shows that thermotolerance induced at a mild

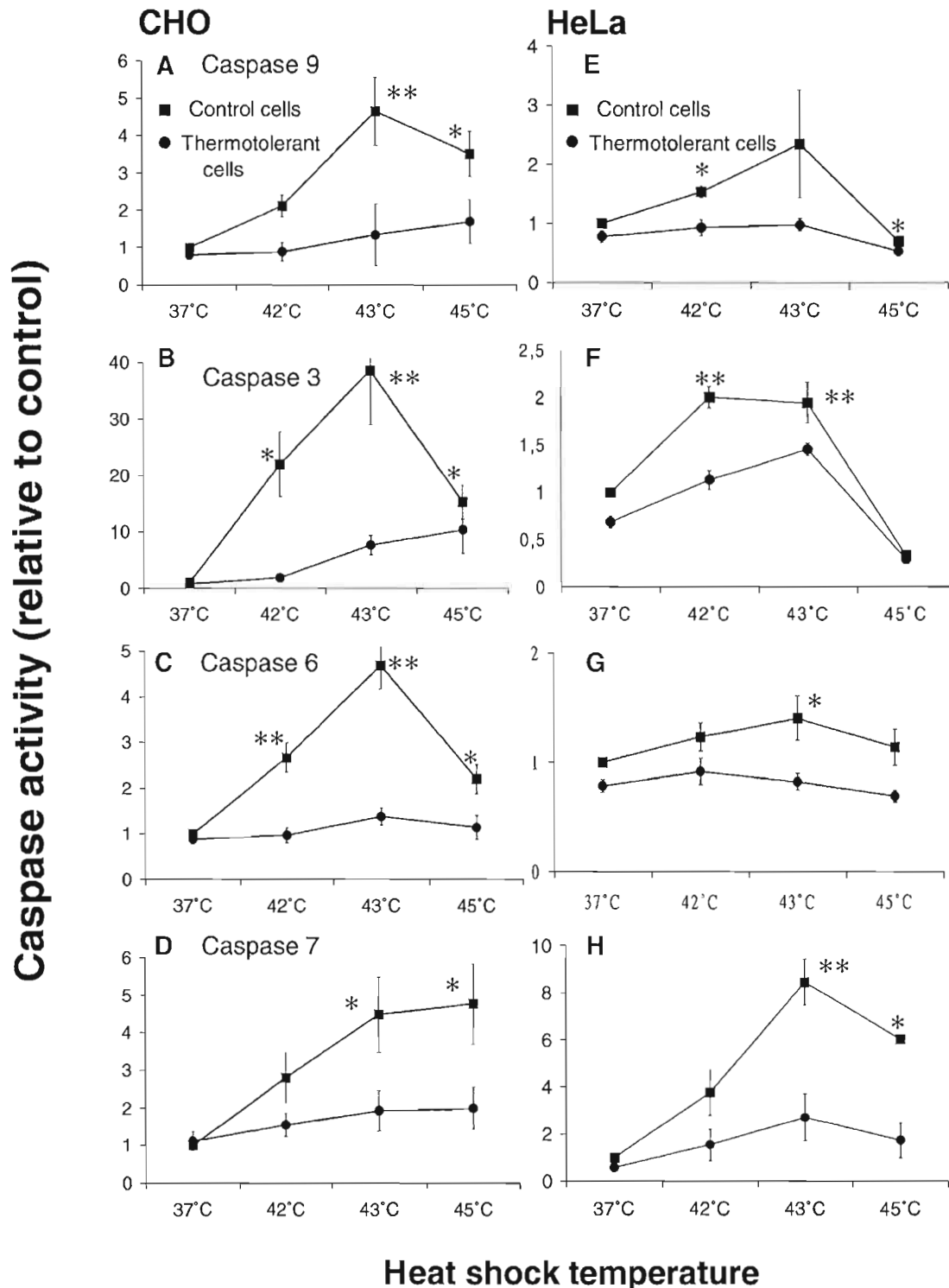


Fig. 6. Thermotolerance protects against activation of caspases by heat shock. Thermotolerant (●) and non-thermotolerant (■) CHO (A–D) and HeLa (E–H) cells were heated (37–45°C) for 1 h (caspase-9) or 2 h (caspases-3, -6, and -7). Activities of caspase-9 (A, E), caspase-3 (B, F), caspase-6 (C, G), and caspase-7 (D, H) were expressed relative to non-thermotolerant cells at 37°C, designated as 1.0. Data represent means \pm SEM from at least three independent experiments. For non-

thermotolerant CHO (A–D) and HeLa (E) cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant increase in caspase activity in cells heated for 2 h at 42–45°C vs. 2 h at 37°C; $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). For analysis of curves in CHO cells, $P < 0.0001$ for 37°C vs. 40°C, for caspases-3, -6, -7, and -9. For analysis of curves in HeLa cells, $P < 0.0001$ for caspases-3 and -6 and $P < 0.001$ for caspases-7 and -9.

temperature of 40°C can efficiently inhibit apoptosis. In thermotolerant CHO and HeLa cells, inhibition was demonstrated for all of the apoptotic events evaluated throughout the mitochondrial pathway, from the heat

shock-induced loss of mitochondrial membrane potential, to the cleavage of caspase substrates. Several studies reported that thermotolerance induced at higher temperatures (42–45°C), followed by the return of cells

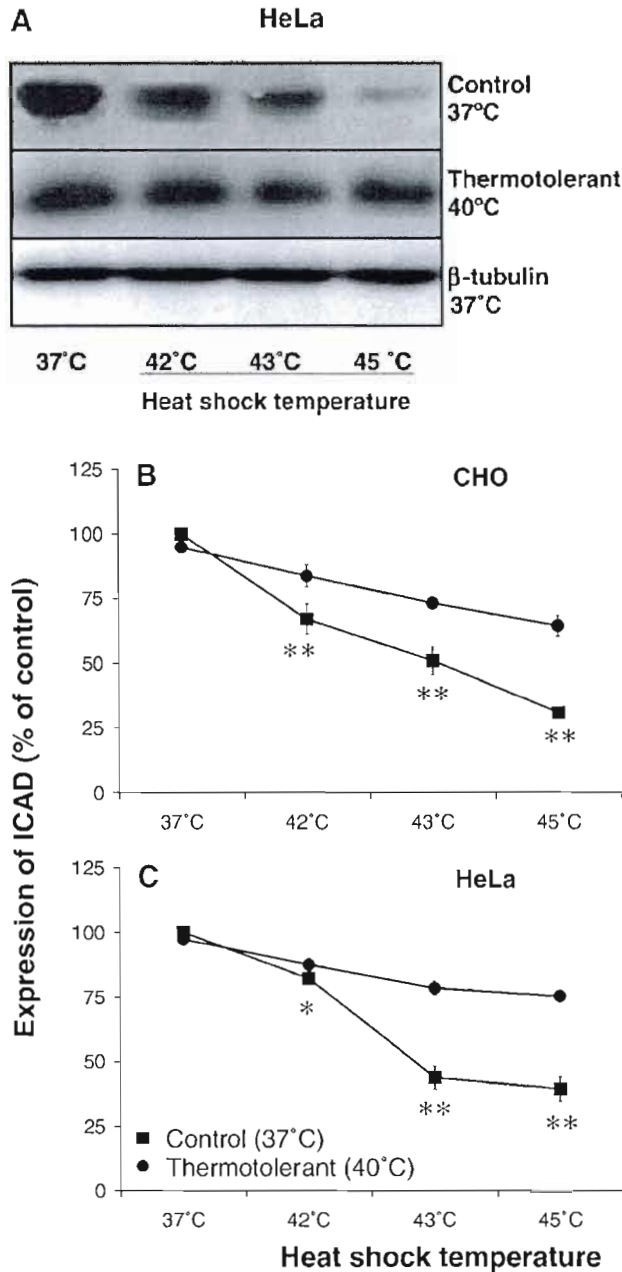


Fig. 7. Thermotolerance decreases heat shock-induced ICAD cleavage. Thermotolerant (●) and non-thermotolerant (■) cells were heated (37–45°C) for 2 h. Proteins from HeLa (A) and CHO (data not shown) cells were detected with a rabbit monoclonal antibody that recognizes both human and hamster non-cleaved forms of ICAD. β -tubulin was the loading control. Protein levels were quantified by densitometry in (B) CHO and (C) HeLa cells and expressed relative to control cells at 37°C (100%). Mean \pm SEM were determined from two independent experiments with duplicate samples. For non-thermotolerant CHO and HeLa cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant decrease in ICAD expression in cells heated for 2 h at 42–45°C vs. 2 h at 37°C; $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). For analysis of curves for thermotolerant vs. non-thermotolerant CHO and HeLa cells, $P < 0.0001$.

to 37°C (e.g. for 2, 6, or 24 h), protected cells against apoptosis induced by heat shock (Mosser and Martin, 1992; Boreham et al., 1997; Poe and O'Neill, 1997; Samali et al., 2001), drugs (Samali and Cotter, 1996), and tumor necrosis factor- α (Buzzard et al., 1998).

Several studies reported a correlation between thermotolerance and induction of HSPs such as HSP27, HSP72, and HSP90. Compared to these studies where thermotolerance was induced at high temperatures such as 42–44°C, our findings show that thermotolerance can be induced when cells are incubated for longer periods of time at mild temperatures in the fever range, thus preventing biochemical injuries caused by acute exposure to lethal temperatures (42–45°C).

HSPs could be involved, at least in part, in the protective effect of thermotolerance induced at 40°C against heat shock-induced apoptosis in CHO and HeLa cells. Several studies, through gene transfection and immunodepletion, have reported protective roles for HSP27, HSP72, and HSP90 against apoptosis (Sreedhar and Csermely, 2004). However, the complex mechanisms by which HSPs suppress apoptosis are not entirely understood. HSP27 can bind to proteins such as procaspase-3 and cytochrome c, thus preventing cytochrome c-mediated interaction of Apaf-1 with procaspase-9 (Bruey et al., 2000; Pandey et al., 2000a; Concannon et al., 2001). HSP72 directly associates with apaf-1, preventing its association with procaspase-9 and inhibition of apoptosome formation (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000). HSP72 inhibited processing of procaspase-3 and heat shock-induced PARP cleavage, suggesting that it can prevent the effector steps of apoptotic cell death (Mosser et al., 1997; Buzzard et al., 1998). HSP90 directly binds to Apaf-1, thus blocking activation of caspase-9 via the apoptosome (Pandey et al., 2000b). Thus, HSP27, HSP72, and HSP90 can interfere with apoptosome formation and inhibit the mitochondrial pathway of caspase-dependent cell death. Recently, HSPs were recognized *in vivo* to protect heart and brain against deleterious stimuli, such as ischemia, and lungs and liver against sepsis (Jaattela, 1999). These findings suggest that HSPs could have protective functions in several disease states. In this case, the induction of HSPs *in vivo* could be feasible at mildly elevated temperatures such as 39.5–41°C.

The loss of mitochondrial membrane potential and impairment of mitochondrial function is a common event in apoptosis. This often precedes the release of pro-apoptotic factors, such as cytochrome c, apoptosis inducing factor (AIF), and second mitochondria-derived activator of caspase (Smac)/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI (DIABLO), from mitochondria into the cytosol. Membrane hyperpolarization often precedes the loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. Mitochondrial hyperpolarization is often associated with enhanced ATP-generating capacity. Mitochondrial membrane potential is associated with the activity of the electron transport chain (Alberts et al., 1994). The electron transport chain pumps protons out of the matrix, which establishes an electrochemical proton gradient across the inner membrane. The resulting electrochemical gradient drives protons back through an ATP synthase complex, which in turn uses energy of the proton flow to synthesize ATP. Under certain conditions, the respiratory chain works at a higher regimen, leading to a higher electrochemical gradient and thus hyperpolarization of the membrane. Protein folding mediated by molecular chaperones and disruption of small-protein aggregates formed during stress are ATP-dependent processes (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). During thermotolerance at 40°C, where HSPs are expressed at higher levels, there is a higher requirement for ATP, which is consistent with membrane hyperpolarization.

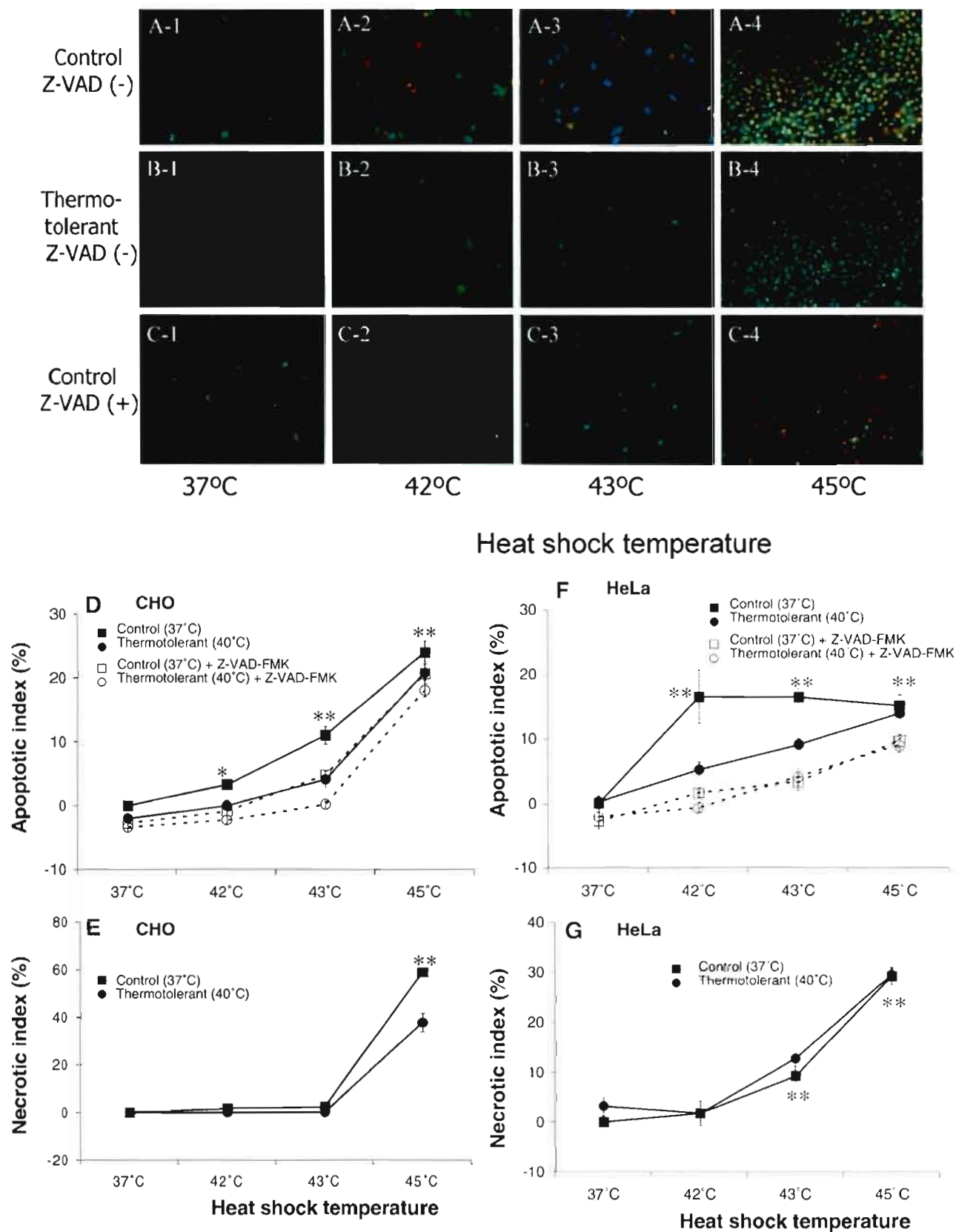


Fig. 8. Thermotolerance at 40°C protects against chromatin condensation caused by heat shock. Thermotolerant (B1–B4) and non-thermotolerant (A1–A4) CHO cells were heated (37–45°C) for 2 h. Non-thermotolerant (C1–C4) cells were pre-treated with Z-VAD-fmk (10 μ M) for 1 h prior to heat shock treatment. Nuclear morphology was assessed by fluorescence microscopy using Hoechst 33258 to detect blue-green apoptotic cells and propidium iodide to detect red necrotic cells. Magnification: 320 \times . Fractions of apoptotic (D, F) and necrotic (E, G) CHO and HeLa cells are relative to total cells, in non-thermotolerant cells, with (□) or without (■) Z-VAD-fmk, or in thermotolerant cells, with (○) or without (●) Z-VAD-fmk. D, F: For

non-thermotolerant CHO and HeLa cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant increase in apoptotic index for cells heated for 2 h at 42–45°C vs. 2 h at 37°C; $P < 0.05$ (*), $P < 0.001$ (**). Analysis of curves showed $P < 0.001$ for thermotolerant versus non-thermotolerant CHO cells and $P < 0.05$ for HeLa cells. For analysis of curves for CHO and HeLa cells, with or without Z-VAD-fmk, $P < 0.05$. E, G: For non-thermotolerant cells preheated at 37°C for 3 h, there was a significant increase in necrotic index for cells heated for 2 h at 45°C (HeLa) and 43°C and 45°C (CHO), vs. 2 h at 37°C. Data are means \pm SEM for at least three experiments.

The heat shock response has been largely studied at relatively high, lethal temperatures. However, the heat shock response at lower temperatures has received little attention and is not clearly understood. Mammalian body temperatures are carefully controlled, but increase by a few degrees during fevers. Fever temperatures can activate the heat shock response, but are also beneficial to organisms during infection (Hasday and Singh, 2000). Interestingly, hsf1 also activates the transcription of cytokines involved in host defences against infections. It was reported that mild heat shock (39.5°C for 8–16 h) at febrile temperatures may regulate cell proliferation by inducing the cell cycle check-point protein cyclin D1, along with growth factors (Han et al., 2002). However, cyclin D1 was not induced by severe temperatures.

Cancer patients undergoing high dose chemotherapy often experience fevers during periods of neutrophil depletion. It has not been determined in vivo whether febrile temperatures could induce thermotolerance and HSPs, which could attenuate tumor responses to cytotoxic treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and hyperthermia, which aim to destroy tumor cells by apoptotic cell death. This is the first study in vitro which demonstrates attenuation of hyperthermia-induced apoptosis by thermotolerance induced at fever temperatures.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michel Marion and Denis Flipo for technical assistance and Bertrand Fournier for statistical analyses. Financial support was from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (D.A.A.-B.), the Cancer Research Society, Inc. (D.A.A.-B.) and the University Mission of Tunisia in North America (scholarship to A.B.).

LITERATURE CITED

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular biology of the cell. London: Garland Publishing, Inc.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469–475.
- Boreham DR, Dolling JA, Maves SR, Miller S, Morrison DP, Mitchel RE. 1997. Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes. *Biochem Cell Biol* 75:393–399.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Latoud CDSG, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2:645–652.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. 1998. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273:17147–17153.
- Concannon CG, Orrenius S, Samali A. 2001. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 9:195–201.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13:795–808.
- Field SB, Anderson RL. 1982. Thermotolerance: A review of observations and possible mechanism. *Natl Cancer Inst Monogr* 61:193–201.
- Gill RR, Gbur CJ, Fisher BJ, Hess ML, Fowler AA, Kukreja RC, Sholley MM. 1998. Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 30:2739–2749.
- Hahn GM, Li GC. 1982. Interactions of hyperthermia and drugs: Treatments and probes. *Natl Cancer Inst Monogr* 61:317–323.
- Han SI, Oh SY, Jeon WJ, Kim JM, Lee JH, Chung HY, Choi YH, Yoo MA, Kim HD, Kang HS. 2002. Mild heat shock induces cyclin D1 synthesis through multiple Ras signal pathways. *FEBS Lett* 515:141–145.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852–1858.
- Hasday JD, Singh IS. 2000. Fever and the heat shock response: Distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress Chaperones* 5:471–480.
- Hoorens A, Strange G, Pavlovic D, Pipeleers D. 2001. Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 50:551–557.
- Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J. 1991. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res* 51:5245–5252.
- Jaattela M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31:261–271.
- Jurkiewicz M, Averill-Bates DA, Marion M, Denizeau F. 2004. Involvement of mitochondrial and death receptor pathways in tributyltin-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1693:15–27.
- Kast C, Gros P. 1998. Epitope insertion favors a six transmembrane domain model for the carboxy-terminal portion of the multidrug resistance-associated protein. *Biochemistry* 37:2305–2313.
- Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J. 1999. Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res* 59:3404–3410.
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177–2186.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Landry J, Bernier D, Chretien P, Nicole LM, Tanguay RM, Marceau N. 1982. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res* 42:2457–2461.
- Li GC, Werb Z. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3218–3222.
- Ling V, Thompson LH. 1974. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol* 83:103–116.
- Liu FF, Wilson BC. 1998. Hyperthermia and photodynamic therapy. In: Tannock IF, Hill RP, editors. The basic science of oncology. Toronto: McGraw-Hill. pp 443–465.
- Lord-Fontaine S, Averill-Bates DA. 2002. Heat shock inactivates cellular antioxidant defences against hydrogen peroxide: Protection by glucose. *Free Radical Biol Med* 32:752–765.
- Luft JC, Benjamin IJ, Mestri L, Dix DJ. 2001. Heat shock factor 1-mediated thermotolerance prevents cell death and results in G2/M cell cycle arrest. *Cell Stress Chaperones* 6:326–336.
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1–15.
- McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273:7523–7528.
- Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J Cell Biol* 106:1105–1116.
- Mosser DD, Martin LH. 1992. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J Cell Physiol* 151:561–570.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Larose DC, Massie B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17:5317–5327.
- Nicholson DW. 1999. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Cell Death Diff* 6:1028–1042.
- Ohtsubo T, Igawa H, Saito T, Matsumoto H, Park H, Song CW, Kano E, Saito H. 2001. Enhancement of cell killing by induction of apoptosis after treatment with mild hyperthermia at 42 degrees C and cisplatin. *Radiat Res* 156:103–109.
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S. 2000a. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19:1975–1981.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. 2000b. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19:4310–4322.
- Parsell DA, Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann Rev Genet* 27:437–466.
- Poe BS, O'Neill KL. 1997. Inhibition of protein synthesis sensitizes thermotolerant cells to heat shock induced apoptosis. *Apoptosis* 2:510–517.
- Przybytkowski E, Bates JH, Averill-Bates DA, Mackillop WJ. 1986. Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: The influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiat Res* 107:317–331.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476–483.
- Samali A, Cotter TG. 1996. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 223:163–170.
- Samali A, Cai J, Zhivotovskiy B, Jones DP, Orrenius S. 1999. Presence of pre-apoptotic complex of procaspase-3, HSP 60 et HSP 10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J* 18:2040–2048.
- Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, Cotgreave IA, Arrigo AP, Orrenius S. 2001. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones* 6:49–58.
- Sreedhar AS, Cserrmely P. 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: New strategies in tumor therapy. *Pharmacol Ther* 101:227–257.
- Stennicke HR, Salvesen GS. 1997. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 272:25719–25723.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217–245.
- Subject JR, Sciandra JJ, Johnson RJ. 1982. Heat shock proteins and thermotolerance: a comparison of induction kinetics. *Br J Radiol* 55:579–584.
- Turcotte S, Averill-Bates DA. 2001. Sensitization to the cytotoxicity of melphalan by ethacrynic acid and hyperthermia in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res* 156:272–282.
- Van der Zee J. 2002. Heating the patient: A promising approach? *Ann Oncol* 13:1173–1184.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 3:487–497.